

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Microbiología



**DETECCIÓN DE ADN DE CITOMEGALOVIRUS,
VIRUS DE EPSTEIN-BARR Y HERPESVIRUS 6 EN
ENFERMOS TRANSPLANTADOS RENALES**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Atef Kankan Kanaan

Bajo la dirección de la doctora
M^a Isabel Cour Bóveda

Madrid, 2002

ISBN: 84-669-2102-8

T 25926

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA**



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE



5317329697



BIBLIOTECA

**DETECCIÓN DE ADN DE CITOMEGALOVIRUS, VIRUS
DE EPSTEIN-BARR Y HERPESVIRUS 6 EN ENFERMOS
TRASPLANTADOS RENALES**

TESIS DOCTORAL

ATEF KANAAN KANAAN

Madrid 2002



DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE
28040 MADRID

M^a Isabel Cour Bóveda, Profesor Titular del Departamento de Microbiología de la
Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid

INFORMA

Que **D. Atef Kanaan Kanaan**, licenciado en Medicina y Cirugía, ha realizado,
bajo mi dirección, el trabajo titulado **"DETECCIÓN DE ADN DE
CITOMEGALOVIRUS, VIRUS DE EPSTEIN-BARR Y HERPESVIRUS 6 EN
ENFERMOS TRASPLANTADOS RENALES"**, y que esta memoria cumple todos
los requisitos para ser presentada como Tesis Doctoral.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firmo el presente certificado en Madrid a
20 de Diciembre de 2001.

Fdo.: M.I. Cour Bóveda

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Juan J. Picazo, por brindarme la posibilidad de realizar este proyecto en el Departamento de Microbiología.

A la Dra. M^a Isabel Cour Bóveda, por dirigir esta tesis con dedicación. Por todo lo que he aprendido trabajando a su lado, y por su apoyo en los momentos difíciles. Por ser una persona excepcional.

Mi gratitud al Servicio de Nefrología por la generosa contribución en la obtención de muestras y al Banco de Sangre por la obtención de muestras de sangre de donantes.

A la Dra. Cristina Hernández, por su estimable ayuda en la aplicación de los análisis estadísticos y sacar la máxima rentabilidad de los resultados del estudio, haciendo que esta parte sea agradable y amena.

A Roberto Álvarez y a Mar Benedicto, por ofrecerme su amistad y hacerme pasar buenos ratos en su compañía.

A Esther Culebras, quiero agradecer su disposición y apoyo.

A todo el personal del Departamento de Microbiología que ha contribuido al desarrollo de este trabajo.

A mi mujer y mis dos hijas por su apoyo incondicional y comprensión.

A Evelyn, Laura y Miriam.

A mis padres.

ÍNDICE

1.INTRODUCCIÓN	2
1.A. TRASPLANTE RENAL	2
1.A.1. Evaluación pretrasplante del donante y del receptor	3
I- Evaluación y seguimiento del candidato a trasplante renal	3
II- Evaluación del donante	6
1.A.2. Tipo de donante	6
I- Donante vivo	6
II- Donante cadáver	6
1.A.3. Extracción y preservación de órganos	7
I- Nefrectomía de donante cadáver	7
II- Nefrectomía de donante vivo	7
III- Preservación renal	7
1.A.4. Técnica del trasplante renal	8
I- Trasplante renal heterotópico	8
II- Trasplante renal ortotópico	8
III- Trasplante renal en bloque	8
1.A.5. Inmunología del trasplante	9
• Respuesta inmune	10
1.A.6. Tratamiento inmunosupresor	11
1.A.7. Evolución del trasplante renal	14
I- Rechazo de injerto	14
II- Fracaso renal agudo	16
• Necrosis tubular aguda (NTA)	17
• Glomerulopatías en el injerto	17
III- Toxicidad por Ciclosporina	18
1.A.8. Complicaciones del trasplante	19
I- Complicaciones urológicas	19
• Linfocele	19
• Fístula urinaria	20
• Obstrucción ureteral	20

• Reflujo vésico-ureteral	21
II- Complicaciones infecciosas	21
III- Complicaciones cardiovasculares	22
• Hipertensión arterial	23
• Estenosis de la arteria renal	23
IV. Complicaciones digestivas	23
V. Complicaciones tumorales	24
VI. Otras complicaciones	25
• Trastornos hematológicos	25
• Complicaciones óseas	25
• La hipercalcemia	25
1.A.9. Resultados del trasplante renal	25
1.B. FAMILIA <i>HERPESVIRIDAE</i>	27
1.B.1. Sistemática	27
• Subfamilia <i>Alphaherpesvirinae</i>	28
• Subfamilia <i>Betaherpesvirinae</i>	29
• Subfamilia <i>Gammaherpesvirinae</i>	29
1.B.2. Estructura	30
1.B.3. Genoma de los virus herpes	31
1.B.4. Replicación	32
1.B.5. Patogenia	34
1.B.6. Epidemiología	38
1.B.7. Manifestaciones clínicas	38
1.B.8. Diagnóstico	42
1.B.9. Tratamiento	44
1.B.10. Prevención	46
1.C. Técnicas para la detección de ácidos nucleicos	46
1.C.1. Dot-blot	47
1.C.2. Southern blot	47
1.C.3. Hibridación in situ	47
1.C.4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	48

2. OBJETIVOS	50
 3. MATERIAL Y MÉTODOS	 54
3.A. Pacientes	55
3.B. Muestras	55
3.C. Extracción del ADN de los linfocitos obtenidos de sangre total	56
3.C.1. Reactivos	56
3.C.2. Extracción del ADN de los leucocitos	56
3.D. Extracción del ADN de suero	58
3.D.1. Reactivos	58
3.D.2. Extracción del ADN viral del suero	58
3.E. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	58
3.E.1. Reactivos	58
3.E.2. Iniciadores	59
3.E.3. Mezcla de reacción	60
3.E.4. Controles	61
3.E.5. Amplificación	62
3.E.6. Electroforesis	62
• Reactivos	62
3.E.7. Determinación de la sensibilidad de la técnica	64
3.F. PCR anidada, doble PCR o <i>nested</i> PCR	65
3.F.1. Iniciadores	65
3.F.2. Mezcla de reacción	66
3.F.3. Controles	67
3.F.4. Amplificación	67
3.F.5. Electroforesis	68
3.F.6. Determinación de la sensibilidad de la técnica	69
3.G. Hibridación	70
3.G.1. Reactivos	70
3.G.2. Técnica de ADN-enzimoinmunoensayo (DEIA)	70
3.H. PCR cuantitativa	72
3.H.1. Funcionamiento del aparato Rotor-Gene 2000	72
3.H.2. Reactivos	73

3.H.3. Diseño de la sonda TaqMan	73
3.H.4. Iniciadores y sonda	74
3.H.5. Mezcla de reacción	74
3.H.6. Metodología de PCR cuantitativa en tiempo real	75
3.I. Definiciones	81
3.J. Análisis estadístico	81
4. RESULTADOS	84
4.A. Resultados de la Reacción en cadena de la polimerasa anidada o doble (<i>nested PCR</i>)	84
4.A.1. Prevalencia global de la infección por CMV, VEB y HVH6.	
Distribución por sexo	84
I- Muestras de sangre total	84
II- Muestras de suero	87
4.A.2. Influencia de la edad en la prevalencia de infección por CMV, VEB y HVH-6	94
4.A.3. Estudio de las prevalencias de coinfección	97
I. Detección de ADN de un virus	97
II. Detección de ADN de dos o tres virus	98
III. Análisis de las prevalencias de coinfección por dos virus en sangre y suero	102
4.A.4. Prevalencias de coinfección sintomática	105
4.B. Hibridación	106
4.C. Comparación de resultados de PCR nested con otras técnicas de diagnóstico	107
4.C.1. Comparación de resultados entre PCR <i>nested</i> en sangre y suero con la detección de anticuerpos específicos frente a CMV y VEB	107
I. Comparación de las prevalencias por la PCR <i>nested</i> y serología	107
II. Concordancia de resultados entre la PCR nested y la serología para la detección de CMV y VEB	111
4.C.2. Comparación de resultados de diferentes técnicas para la detección de CMV	112

I. Prevalencias de CMV en sangre por la PCR <i>nested</i> , la Antigenemia y el cultivo y en suero por la PCR <i>nested</i> y la detección de IgM específica	112
II. Concordancia de resultados de las diferentes técnicas utilizadas para el diagnóstico de infección por CMV	114
III. Concordancia entre los resultados de las pruebas diagnósticas y la sospecha clínica	115
4.D. Grupo de enfermos seronegativos para CMV en el pretrasplante y su evolución	116
4.E. Índices de validez de criterios de las técnicas de diagnóstico para la detección de CMV	117
I. Al considerar el cultivo como la técnica de referencia	117
II. Al considerar la PCR <i>nested</i> en suero como la técnica de referencia	121
4.F. PCR cuantitativa en el diagnóstico de la infección sintomática y asintomática por CMV	125
4.F.1. Correlación de la carga viral con la clínica y el tratamiento	125
4.F.2. Comparación de PCR cuantitativa con otras técnicas de diagnóstico	127
I. Comparación de la PCR cuantitativa con PCR <i>nested</i> en suero	128
II- Comparación de la PCR cuantitativa con la Antigenemia	129
III- Comparación de la PCR cuantitativa con el cultivo	130
IV- Comparación de la PCR cuantitativa con la detección de IgM	131
V. Comparación de la PCR cuantitativa con la sospecha clínica	132
5. DISCUSIÓN	133
5.A. Prevalencia global de ADN de CMV, VEB y HHV-6 por PCR <i>nested</i>	135
5.A.1. En muestras de sangre	135
5.A.2. En muestras de suero	136
5.B. Influencia del sexo y la edad en las prevalencias de ADN de los tres virus	138
5.C. Prevalencias de las coinfecciones encontradas	138
5.D. Prevalencias de coinfección sintomática	140
5.E. Hibridación	142
5.F. Comparación de prevalencias y concordancia de resultados entre la PCR <i>nested</i> y otras técnicas de diagnóstico realizadas en el laboratorio	142
5.F.1. Con la serología de CMV y VEB	142

5.F.2. Con las técnicas utilizadas para el diagnóstico de la infección activa por CMV	143
5.G. Índices de validez de criterios y análisis de las pruebas de diagnóstico para la detección de CMV	145
5.H. Correlación entre las pruebas de diagnóstico y la sospecha clínica de enfermedad por CMV	147
5.I. Enfermos seronegativos para CMV en el pretrasplante y su evolución	148
5.J. PCR cuantitativa en tiempo real en el diagnóstico de infección y enfermedad por CMV	150
5.J.1. Correlación de la carga viral con la clínica y el tratamiento	150
5.J.2. Comparación de las técnicas de diagnóstico para detectar la infección activa por CMV	151
5.J.3. PCR cuantitativa en el diagnóstico de la enfermedad por CMV	152
6. CONCLUSIONES	153
7. BIBLIOGRAFÍA	157

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.A. Trasplante Renal

Los avances obtenidos en el trasplante de órganos durante los últimos 25 años han hecho que el trasplante de riñón sea consolidado como un procedimiento terapéutico adecuado para los enfermos con insuficiencia renal crónica terminal, al mejorar la supervivencia y la calidad de vida de los receptores. Estos avances se han logrado en cinco áreas importantes¹:

1. Óptima tipificación en el donante y el receptor, minimizando con ello la aparición de rechazo.
2. Mejoras tanto en la preparación de receptor como en la preservación del órgano del donante.
3. Técnica quirúrgica adecuada.
4. Tratamiento inmunosupresor preciso e individualizado.
5. Conocimiento profundo de la prevención, diagnóstico y tratamiento de la infección.

España es uno de los países con gran actividad en el trasplante de órganos. El primer trasplante renal se realizó en 1965² y en los últimos 15 años se ha realizado una media anual de 1518 trasplantes renales³, lo que hace que sea considerado uno de los países con mayor índice de trasplantes renales realizados por cada millón de habitantes.

1.A.1. Evaluación pretrasplante del donante y del receptor

La selección del receptor y del donante sería la primera medida a considerar para evitar las complicaciones que pueden aparecer en el período del postrasplante.

I- Evaluación y seguimiento del candidato a trasplante renal

La indicación del trasplante renal en pacientes con insuficiencia renal crónica terminal está determinada por la calidad de vida del paciente y por el hecho de si los beneficios del tratamiento compensan los riesgos.

Existe una serie de factores relacionados con el paciente que conllevan una mayor mortalidad y pérdida del injerto: edad pacientes menores de 5 años y mayores de 60, diabetes que últimamente ha mejorado desde el uso de ciclosporina (CsA) y dosis menores de corticoides, y enfermedad cardiovascular severa⁴. Las enfermedades de Fabry, oxalosis y amiloidosis que tenían resultados desalentadores, y se consideraban como contraindicaciones, han mejorado la supervivencia en las últimas series publicadas⁵. En la tabla 1 se muestran las contraindicaciones absolutas y relativas al trasplante⁴.

Los enfermos candidatos a trasplante, mientras permanecen en listas de espera deben ser evaluados correctamente antes de la realización del mismo. Debe realizarse una historia clínica detallada, exploración física minuciosa y los estudios complementarios que deben incluir las pruebas básicas: hemograma completo, VSG, radiografía de tórax, bioquímica hepática y de función renal. Además, para evitar que pasen inadvertidas infecciones activas, se realizarán las pruebas⁶ que figuran en la tabla 2.

Tabla 1. Contraindicaciones del trasplante renal

Absolutas:- Infección activa

- Tumores malignos no operables
- Enfermedad vascular severa
- Alteraciones importantes de la coagulación
- Demencia
- Negativa del paciente

Relativas: - Enfermedades renales con alta recurrencia

- Alteraciones urológicas (reflujo severo, vejiga neurógena)
 - Enfermedad sistémica activa
 - Psicosis incontrolada
 - Falta de colaboración del paciente
 - Mal estado general
 - Arterioesclerosis generalizada
-

Tabla 2. Pruebas para la evaluación del candidato a trasplante

- HIV-1 e HIV-2. Mediante técnica de enzimoimmunoanálisis (EIA) de segunda y tercera generación y confirmando los positivos con Western-Blot y/o RNA-PCR
 - Virus B y D de la hepatitis (VHB y VHD). HbsAg, HbeAG, anti-HBc, anti-HBs, anti-HD mediante técnicas EIA y determinación del ADN viral por PCR
 - Virus C de la hepatitis (VHC). Anti-VHC con EIA-2 con determinación del ADN viral mediante PCR
 - Citomegalovirus (CMV). Determinación de IgG mediante técnicas de EIA o aglutinación con látex
 - Virus de Epstein-Barr (VEB). Determinación de anticuerpos IgG específica frente al antígeno de la cápside viral, medidos preferentemente por IFI convencional
 - Virus de varicela zoster (VVZ). Determinación de IgG específica por método de EIA indirecto o por IFI convencional o automatizada
 - Virus herpes simple (VHS) tipo I y II. Determinación de anticuerpos IgG específica mediante una prueba EIA
 - *Toxoplasma gondii*. Determinación de IgG específica mediante técnicas de EIA, aglutinación directa modificada o inmunofluorescencia indirecta
 - Lúes. Estudio mediante prueba reagínica (VDRL o RPR). En los casos positivos es precisa la confirmación con una prueba treponémica
 - Prueba cutánea de la tuberculina y test de reactividad cutáneo paralelo
 - Cultivos de sangre, orina, esputo, heces y de todos los focos con sospecha de infección activa.
-

La necesidad de transfusiones sanguíneas en los candidatos a trasplante renal para conseguir una mejor tolerancia al mismo, ha perdido importancia desde la utilización de la CsA. Los riesgos de infección y sensibilización contrarrestan cualquier beneficio de supervivencia del injerto⁵.

II- Evaluación del donante

Para la evaluación del donante se utiliza el mismo método que para el receptor realizando una historia clínica, un examen físico y finalmente se realizarán los estudios complementarios descritos en la tabla 2. De ellos la determinación de anticuerpos anti-HIV, HBs Ag, anticuerpos anti-VHC, VDRL o RPR y probablemente anti-HBc, son las determinaciones necesarias para la donación de órganos. El objetivo es evitar la transmisión de infecciones potencialmente mortales a través del injerto y siempre es recomendable congelar sueros del donante y del receptor para futuras determinaciones⁶.

1.A.2. Tipo de donante

I- Donante vivo

La existencia de este tipo de donante viene dada por la mejor supervivencia del injerto y del paciente, y por la carencia de donantes cadáver. Varía mucho de unos países a otros, constituyendo un 15% en Europa y 30% en Estados Unidos. En el estudio pretrasplante ha de realizarse la tipación HLA, determinación del grupo sanguíneo, evaluación médica general con especial atención a la función renal y tracto urinario, así como la realización de arteriografía renal para la identificación de posibles variaciones anatómicas vasculares de riñón y del sistema colector⁶.

II- Donante cadáver

La mayoría de los riñones utilizados para trasplante son de cadáver. Si bien los resultados son mejores cuando se utilizan riñones de donantes entre 5 y 60 años, algunos

centros trasplantan edades inferiores o superiores. Se habla de donantes subóptimos⁷ refiriéndose a órganos de personas mayores de 65 o menores de 3 años, extracciones en pacientes con asistolia o en presencia de virus B o anticuerpos contra el virus C de la hepatitis.

1.A.3. Extracción y preservación de órganos

I- Nefrectomía de donante cadáver

En la mayoría de los centros, las extracciones son multiorgánicas, donde además de los riñones se extraen corazón, hígado y, en ocasiones, pulmón y páncreas. Los riñones son perfundidos in situ y extraídos en bloque con una porción de aorta y de cava. Si no existe extracción multiorgánica, solo se extraen los riñones, intentando que la isquemia caliente (tiempo que transcurre entre el cese de la circulación sanguínea renal y el comienzo del lavado con líquido de perfusión), sea lo más cercana a cero minutos⁴.

II- Nefrectomía de donante vivo

Suele elegirse el riñón izquierdo por la mayor longitud de la vena renal, excepto cuando existen variaciones anatómicas vasculares o urológicas. La isquemia caliente nunca será de cero minutos, ya que el lavado con el líquido de perfusión se tiene que hacer una vez extraído el órgano⁵.

III- Preservación renal

El almacenamiento en frío es el método más usado, consiguiéndose preservaciones de 48 horas o superiores. Los riñones son perfundidos con una solución fría de composición electrolítica similar a la intracelular, para lavado y almacenamiento de los mismos. Con esta solución se pretende minimizar el edema celular, evitar la pérdida de potasio intracelular y evitar la producción de productos tóxicos. Las soluciones más utilizadas son la de Euro-Collins y la de la Universidad de Wisconsin⁵.

1.A.4. Técnica del trasplante renal

I- Trasplante renal heterotópico

La localización más frecuente es extraperitoneal en la fosa iliaca derecha o izquierda. La anastomosis de la arteria renal se realiza término-lateral a la arteria iliaca externa o primitiva del receptor, o bien término-terminal con arteria hipogástrica. La vena renal se anastomosa de forma término-lateral con vena cava, o con vena iliaca (común, externa o interna). El uréter se implanta en cara superior de la vejiga, con realización de técnicas antireflujo. Como ventajas tiene la fácil accesibilidad; como desventajas presenta la posibilidad de reflujo vesico-ureteral, trastornos de erección si se utiliza la arteria hipogástrica en la anastomosis y problemas derivados de la vecindad de los vasos iliacos en caso de precisar reintervenciones quirúrgicas⁴.

II- Trasplante renal ortotópico

Consiste en la colocación del injerto en la fosa lumbar izquierda, con anastomosis término-terminal de arteria renal del donante con arteria esplénica del receptor. La anastomosis urológica se realiza mediante unión piel-piel. Permite una mayor protección del órgano, así como un funcionamiento más fisiológico de la vía urinaria, sin que existan problemas de reflujo.

III- Trasplante renal en bloque

Cuando se utilizan riñones de niños muy pequeños o de anencéfalos que presentan problemas técnicos en la anastomosis, se procede al trasplante en bloque de los dos riñones, utilizando parche de aorta y cava para realizar las anastomosis vasculares. Los uréteres se anastomosan a vejiga utilizando como parche el segmento de vejiga del donante con que fueron extraídos⁴.

1.A.5. Inmunología del trasplante

Se ha observado que los injertos entre individuos genéticamente idénticos son perfectamente tolerados sin que se produzca reacciones de rechazo agudo, por lo que se llegó a la conclusión de que determinadas estructuras antigénicas genéticamente determinadas eran las que marcaban la compatibilidad o incompatibilidad tisular (histocompatibilidad). Estas estructuras, complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), son un grupo de genes que codifican los antígenos celulares que marcan la diversidad entre individuos y son los desencadenantes de la respuesta inmune en los aloinjertos. Este grupo de genes se conoce en el hombre como *sistema HLA*. Según la función y la distribución tisular, los antígenos del MHC se dividen en dos grupos⁸:

1. Antígenos de clase I (HLA-A, -B y -C). Son glucoproteínas compuestas de dos cadenas, pesada y ligera. Se expresan en la membrana de casi todas las células nucleadas y plaquetas y activan las células T -CD8 citotóxicas.
2. Antígenos de clase II (HLA-DR, -DP y -DQ). Son glucoproteínas compuestas de dos cadenas de peso molecular similar. Se distribuyen de forma más limitada y se expresan por células presentadoras de antígenos: linfocitos B, macrófagos células dendríticas de órganos linfoides células mesangiales renales, células de Kupffer, células alveolares tipo 2 y células epiteliales del timo. Activan las células de fenotipo CD4.

Los individuos de una misma especie difieren en multitud de antígenos, pero los inmunológicamente activos son los del sistema HLA. Hay otros antígenos que son los del complejo menor de histocompatibilidad que pueden desencadenar ocasionalmente la respuesta inmune. La incompatibilidad en el grupo sanguíneo ABO produce rechazo agudo por la gran vascularización del riñón que lo dota de gran cantidad de células endoteliales que expresan los antígenos del sistema ABO. Esto no ocurre con el sistema Rh.

- **Respuesta inmune**

Las células encargadas de reconocer los antígenos extraños del MHC son los linfocitos T (LT). Tras su reconocimiento se produce lisis y destrucción tisular por LT citotóxicas, aunque también pueden intervenir macrófagos y monocitos. En general los LT expresan diferentes antígenos de membrana. Los que expresan el antígeno CD4 y CD3 son las colaboradoras, y su función en el rechazo agudo es reconocer los antígenos HLA de clase II extraños y poner en marcha la respuesta inmune. Los LT que expresan los antígenos CD8 y CD3 son los citotóxicos, y reconocen los antígenos HLA de clase I y producen lisis celular. En algunas circunstancias las células T CD8 pueden proporcionar su propia función colaboradora, independientemente del subtipo CD4. A la inversa, la célula T CD4 puede tener función citotóxica y mediar la lisis de las células blanco sin la intervención del subtipo CD8. Por ello, tanto las células CD4 como CD8 pueden mediar el rechazo del injerto independientemente. La mayoría de los episodios de rechazo implica a ambos tipos de células. Los linfocitos T supresores (Ts) también expresan los antígenos CD8 y CD3, y están encargados de frenar y modular la respuesta inmune una vez desencadenada. Los LT CD8 (citotóxicos) se encargan de la lisis celular directa previo reconocimiento de un antígeno extraño de clase I por sus receptores⁸⁻¹⁰.

En la respuesta inmune los linfocitos T colaboradores reconocen un antígeno extraño del MHC clase II y produce una serie de linfocinas:

- 1- Interleucina 2 (IL-2), que estimula la proliferación de linfocitos T4 y T8 citotóxicos.
- 2- Interleucina 4 (IL-4). Es un factor estimulador de los linfocitos B responsable de la activación y diferenciación de los LB a células plasmáticas productoras de anticuerpos frente a los antígenos tisulares. Estos anticuerpos se unen al antígeno situado en la superficie tisular, produciéndose la citólisis por células T dependiente de anticuerpos (ADCC).

3- Interferón gamma (IFN-gamma). Aumenta la expresión celular de los antígenos HLA clase I y II y hace que se expresen los de clase II en las células que primariamente no lo hacían, activando además el sistema monocito-macrófago, lo que aumenta la respuesta inmune. Se produce, por tanto, proliferación clonal de LT citotóxicos (CD4 y CD8) dirigida contra células que expresan los antígenos HLA extraños que se va autoamplificando a través de la secreción de las diferentes interleucinas.

Intervienen también mecanismos de daño tisular inespecíficos como la reacción de hipersensibilidad celular retardada o la lisis por células natural killer (NK). En el primero, están implicados los linfocitos T CD4 que reclutan macrófagos y células T CD8, que aumentan su capacidad fagocítica y microbicida. El segundo mecanismo parece tener un papel en el rechazo agudo, pero no ha sido establecido claramente. En la respuesta celular específica, el linfocito T citotóxico es la célula que produce el daño primario al injerto. La respuesta celular no específica es probablemente responsable de la mayoría del daño tardío al injerto.

La presencia frecuente en el suero del receptor de anticuerpos a antígenos preformados, trasplantes anteriores, embarazo, otras transfusiones, puede producir rechazo hiperagudo al revascularizarse el injerto^{9,10}.

1.A.6. Tratamiento inmunosupresor

El éxito del trasplante renal se ha conseguido gracias a la actuación directa sobre la respuesta inmune del receptor mediante fármacos inmunosupresores, con lo que se ha logrado cada vez mejores resultados, tanto en la prevención como en el tratamiento del rechazo. Los fármacos inmunosupresores, por su mecanismo de acción y efecto terapéutico pueden dividirse en diferentes clases.



Los glucocorticoides son una parte indispensable del tratamiento inmunosupresor, aunque no son capaces por si solos de mantener el injerto libre de aloreactividad. Interfieren indirectamente con la proliferación de células T al disminuir la producción de IL-1 e IL-2. La prednisona, especialmente a dosis elevadas, produce linfopenia, monocitopenia, eosinopenia, neutrofilia¹¹.

La azatioprina ejerce su efecto inmunosupresor inhibiendo la proliferación de los linfocitos T y B. Es eficaz en la prevención de rechazo pero carece de efecto en el tratamiento del rechazo establecido. Entre sus efectos adversos destaca la mielosupresión dosisdependiente¹² e induce un mayor riesgo de infección bacteriana o fúngica.

La ciclosporina, como agente inmunosupresor, ha aumentado la supervivencia del injerto y del paciente en todos los trasplantados de órgano sólido, cuando se compara con los resultados obtenidos en la era preciclosporina¹² y es la responsable del gran avance del trasplante. El mecanismo inmunosupresor de la ciclosporina viene determinado por la inhibición de la función de los linfocitos T citotóxicos. Se une a un receptor en la superficie del linfocito y penetra en la célula. Posteriormente, se une a un receptor de alta afinidad, una inmunofilina denominada ciclofilina¹². Este complejo penetra en el núcleo alterando la transcripción del ARN mensajero que codifica para la síntesis de linfocinas, inhibiendo su producción y liberación, específicamente la producción de IL-2 y otras citocinas por los linfocitos T y disminuye la respuesta del linfocito T. De esta manera, disminuye la proliferación de los linfocitos T activados mediada por la acción de IL-2 y suprime la proliferación de linfocitos T citotóxicos respetando las subpoblaciones de linfocitos T supresoras. La baja incidencia de infección en los pacientes tratados solo con ciclosporina por una enfermedad autoinmune sugiere la importancia de los corticoides y otros cofactores en el desarrollo de la infección en el paciente sometido a trasplante. Un

buen número de estudios parece demostrar un menor riesgo de infección en los pacientes con trasplantes renales y cardíacos tratados con ciclosporina y esteroides.

El tacrólimus (FK-506) es 7-10 veces más potente que la ciclosporina, si bien su mecanismo de acción es parecido. Tiene una estructura química diferente, es un macrólido más que un péptido. Al igual que la ciclosporina, el tacrólimus se une de manera no covalente a una inmunofilina, distinta que la ciclofilina denominada fungifilina. El complejo tacrólimus-fungifilina se une de forma específica y competitiva a la calcineurina inhibiendo un paso metabólico precoz de la activación de los linfocitos T, disminuyendo la expresión de algunos genes de activación precoz de los linfocitos T. Su efecto inmunosupresor fundamental es la inhibición de la síntesis y liberación de IL-2 y de la expresión de su receptor linfocitario. Se ha utilizado en diferentes trasplantes de órgano sólido como tratamiento inmunosupresor primario de sustitución de la ciclosporina.

Los sueros antilinfocitarios, o las fracciones activas de las gammaglobulinas contra los linfocitos (ALG) o contra los timocitos (ATG), son preparaciones con gran actividad inmunosupresora. Su mecanismo de acción no es bien conocido, ya que estos sueros tienen muchos anticuerpos con diferentes especificidades. Se sabe que destruyen los linfocitos circulantes y los existentes en los órganos linfoides mediante opsonización por el sistema retículoendotelial. Se han utilizado asociados a ciclosporina, esteroides o azatioprina, en la profilaxis y en el tratamiento de los episodios de rechazo, básicamente aquellos no controlables con esteroides. El anticuerpo OKT3 es el único monoclonal disponible en la inmunosupresión postrasplante. Actúa destruyendo linfocitos CD3 positivos en presencia de las fracciones C₃ y C₉ del complemento. Se ha utilizado con éxito para prevenir el rechazo agudo, como primera elección o como tratamiento de rescate del rechazo resistente a los esteroides. La incidencia de viremia y enfermedad por

CMV está aumentada en los pacientes que reciben tratamiento con sueros antilinfocíticos, tanto policlonales como monoclonales (OKT3). La incidencia de enfermedad por CMV puede pasar del 10-20% al 60% en los pacientes en terapia citolítica, disminuyendo si se realiza un tratamiento con ganciclovir¹³. Otros estudios demuestran un aumento de la enfermedad linfoproliferativa postrasplante secundaria al virus de Epstein-Barr y de la neumonía por *Pneumocystis carinii* así como la enfermedad diseminada por herpes simple tipo I.

El micofenolato es un inmunosupresor cuyo mecanismo de acción viene determinado por la inhibición reversible de novo de la síntesis del nucleótido guanosina, indispensable para la síntesis de ADN y ARN. El resultado final es una inhibición de la proliferación de los linfocitos B y T con una menor mielotoxicidad respecto a la azatioprina. Se ha utilizado con buenos resultados en el contexto del trasplante renal para la prevención del rechazo agudo como para el tratamiento del rechazo refractario a otros tratamientos. En los ensayos clínicos realizados, tanto la viremia como la enfermedad por CMV fueron algo más frecuentes en los pacientes tratados con micofenolato¹⁴.

1.A.7. Evolución del trasplante renal

I- Rechazo de injerto

A pesar de los avances conseguidos en el tratamiento inmunosupresor, el rechazo sigue siendo una causa importante de pérdida del injerto. Como se ha visto, el rechazo describe el daño ocasionado al órgano trasplantado, mediado por células y anticuerpos, que se produce cuando un injerto es reconocido como extraño. Según la clínica y la histología que presenta, el rechazo se clasifica en tres tipos principales: hiperagudo, agudo y crónico⁸⁻¹⁰.

- Rechazo hiperagudo: Es muy raro y usualmente ocurre a los pocos minutos o primeras horas de iniciarse la revascularización. Se produce cuando el receptor de trasplante tiene anticuerpos preformados circulantes contra el sistema HLA del donante. El riñón se torna cianótico, de aspecto moteado y de consistencia blanda. Después de la revascularización del injerto, existe un intenso infiltrado de neutrófilos, seguido de lesiones en los capilares glomerulares y hemorragia. Los neutrófilos interactúan con las células sensibilizadas a través de la reactivación del complemento. Suele ser refractario al tratamiento con inmunosupresores convencionales y precisa la realización de trasplantectomía urgente.
- Rechazo agudo: Ocurre en los primeros días, teniendo su máxima incidencia en los tres primeros meses. Suele cursar con fiebre, disminución o ausencia de diuresis, aumento de urea y creatinina, disminución de sodio en orina y aparición o aumento de proteinuria. En pacientes tratados con CsA, estos hallazgos clínicos pueden ser mínimos, haciendo difícil el diagnóstico diferencial de toxicidad por la misma. Desde el punto de vista anatomopatológico, existen dos tipos: 1) Rechazo celular, en que la respuesta del receptor es predominantemente celular, mediada por células T, dando lugar a edema intersticial, infiltración de corteza por células mononucleares y eosinófilos, nefritis tubulointersticial y tubulitis. 2) Rechazo vascular, en que la respuesta efectora del huésped es predominantemente humoral, mediada por anticuerpos, dando lugar a edema intersticial con moderado infiltrado de células mononucleares y células endoteliales de los capilares, obliteración de arteriolas por trombos y puede haber necrosis cortical. El rechazo agudo celular tiene una alta respuesta al tratamiento, siendo de mucho peor pronóstico el rechazo vascular. Actualmente, el tratamiento de rechazo agudo se basa en la utilización de esteroides a dosis elevadas, anticuerpos policlonales y anticuerpos monoclonales^{4,5,12}. Los corticoesteroides no deben utilizarse en caso de infecciones incontrolables ni

leucopenia intensa. Si después de dosis altas de metilprednisolona por vía intravenosa no se consigue revertir el rechazo, debe realizarse biopsia renal, y si existe infiltrado inflamatorio intenso, debe considerarse el uso de anticuerpos policlonales (gammaglobulina antilinfocítica, gammaglobulina antitimocítica), o bien anticuerpos monoclonales OKT3. En los rechazos agudos con afectación vascular, las posibilidades terapéuticas son menores y el pronóstico es peor.

- **Rechazo crónico:** Es el resultado final de episodios repetidos de rechazos agudos o de un proceso inflamatorio progresivo, por lo que su inicio puede ocurrir en las primeras semanas después del trasplante o en cualquier momento posterior del mismo. Implica al sistema inmune celular y humoral. Los hallazgos clínicos consisten en empeoramiento progresivo de la función renal, proteinuria e hipertensión arterial. Los hallazgos histológicos más característicos son engrosamiento subendotelial de la pared capilar, fibrosis intersticial y atrofia tubular. Deben descartarse otras causas de empeoramiento de la función renal como toxicidad por ciclosporina, estenosis vasculares o ureterales y glomerulopatías recurrentes o de novo. No existe tratamiento específico, llevando progresivamente a la pérdida del riñón. En pacientes que reciben prednisona y azatioprina, la sustitución de ésta por ciclosporina mejora a veces la función renal temporalmente. Asimismo, en pacientes con prednisona y CsA, la disminución de ésta y la asociación de azatioprina puede mejorar la función renal.

II- Fracaso renal agudo

El empeoramiento de la función renal después de trasplante es un hecho frecuente, y en ocasiones, es difícil identificar la causa del mismo: NTA, rechazo o toxicidad por CsA, especialmente durante el primer mes postrasplante, momento en el que pueden coexistir varias. Las causas más frecuentes son:

• **Necrosis tubular aguda (NTA)**

Su incidencia en el trasplante renal de cadáver es variable (30%-90%). Su patogénesis puede ser debida a factores relacionados con el donante (edad avanzada, hipotensión, uso de vasopresores para mantenimiento hemodinámico y parada cardíaca previa a la extracción), tiempos de isquemia caliente y fría alargados, y tiempos de anastomosis prolongados^{4,5}. Se ve más frecuentemente con el uso de CsA y, probablemente, indica toxicidad de la misma en un riñón previamente alterado. Las estrategias encaminadas a disminuir esta complicación son: buen mantenimiento hemodinámico del donante y la administración de manitol previa al desclampaje de la arteria renal.

• **Glomerulopatías en el injerto**

Las glomerulopatías aparecidas después del trasplante pueden llevar a un empeoramiento de la función renal^{4,5}. Existen cuatro tipos diferentes.

1. Glomerulonefritis del donante. Los riñones de un donante cadáver pueden tener glomerulonefritis insospechada. Se han trasplantado riñones con nefropatía IgA no conocida, y de pacientes con nefropatía diabética.

2. Recurrencia de la enfermedad de base. Se han descrito recidivas de todo tipo de glomerulopatías primarias, siendo las más frecuentes las membranoprolifertivas tipo I y II, nefropatía IgA, hialinosis focal y segmentaria, y síndrome hemolítico urémico. Se manifiestan clínicamente por presencia de hematuria microscópica y proteinuria que puede evolucionar a síndrome nefrótico y posterior deterioro de la función renal. Entre las enfermedades sistémicas que pueden recurrir en el injerto se encuentran nefropatía diabética, amiloidosis, cistinosis, oxalosis, enfermedad de Fabry, enfermedad de células falciformes y lupus eritematoso sistémico.

3. Glomerulopatía del trasplante. Es una entidad que puede ser considerada como una forma especial de rechazo crónico. Histológicamente es parecida a la glomerulonefritis membranoproliferativa tipo I. Cursa con hematuria microscópica, proteinuria y empeoramiento de la función renal.

4. Glomerulopatía de novo. Es el desarrollo de glomerulonefritis en pacientes sin historia de enfermedad glomerular. Los tipos más frecuentes son glomerulonefritis membranosa y hialinosis focal y segmentaria.

III- Toxicidad por Ciclosporina

El uso de CsA ha mejorado los resultados obtenidos en el trasplante de órganos, pero se asocia con diferentes efectos tóxicos. El principal y más importante es su nefrotoxicidad^{4,5}.

- Toxicidad aguda: Suele ocurrir entre la 3ª y 4ª semana postrasplante, y se ha visto incluso después de la primera dosis. Generalmente, es debida a niveles elevados de la misma en sangre, pero ha ocurrido incluso con niveles normales o bajos. El hecho primario en la toxicidad aguda consiste en un incremento en las resistencias vasculares, predominantemente a nivel de la arteriola aferente del glomérulo, con disminución del flujo sanguíneo renal. Los cambios histológicos son mínimos, consistiendo en afectación 1) tubular: mitocondrias gigantes, vacuolización tubular y microcalcificaciones, 2) intersticial: infiltración mononuclear y 3) vascular: necrosis arteriolar. Clínicamente, se manifiesta como empeoramiento de la función renal, disminución de la excreción renal de sodio con retención de agua y formación de edemas, acidosis hiperclorémica e hiperpotasemia. Se diferencia histológicamente del rechazo agudo, sobre todo, por la ausencia de infiltrado inflamatorio extenso. La suspensión o disminución de la dosis revertirá dichas lesiones.

- **Toxicidad crónica:** Consiste en disfunción renal irreversible asociada a lesiones vasculares e intersticiales. Dichas lesiones consisten en depósito proteico en la pared arteriolar que produce estrechamiento y obliteración de la luz vascular, y atrofia tubular con fibrosis intersticial. Dichas lesiones son habitualmente progresivas y raramente reversibles a pesar de disminuir las dosis de dicho fármaco.

1.A.8. Complicaciones del trasplante

La técnica quirúrgica está estandarizada y, por tanto, la pérdida de riñones por la misma es mínima.

I. Complicaciones urológicas

Dichas complicaciones pueden ser evitadas con un estudio previo del tracto urinario del receptor, así como con una cuidadosa extracción del riñón del donante. Entre las complicaciones más frecuentes están:

- **Linfocele**

Consiste en la presencia de una masa quística en las proximidades del riñón, producido por la sección de vasos linfáticos y no ligados correctamente, durante la intervención quirúrgica. Usualmente se presenta en los primeros meses postrasplante, pudiendo causar, si la colección es importante, y por efecto de masa, deterioro de la función renal por compresión del uréter, hinchazón de la pierna por dificultar el retorno de la vena iliaca, polaquiuria por disminución de la capacidad vesical, o tenesmo por compresión rectal^{4,5}. Se diagnostica por estudio ecográfico, y el tratamiento consiste en drenaje externo del mismo, en ocasiones precisa drenaje interno a cavidad peritoneal. La profilaxis radica en una técnica quirúrgica correcta.

• Fístula urinaria

Es una complicación infrecuente, pero seria; ocurre en los primeros momentos después del trasplante. Generalmente se debe a traumatismos del uréter durante la extracción, necrosis total o distal del uréter secundario a trombosis de la arteria ureteral, o a errores técnicos en el implante de uréter o vejiga⁵. Clínicamente se caracteriza por dolor, disminución o ausencia de diuresis vesical, empastamiento de la zona de la herida debido a la colección de orina “urinoma”, pérdida de orina por la herida o por pericatóter de drenaje y, en ocasiones, fiebre inexplicable y edema de escroto o vulva. Se diagnostica por estudio ecográfico, viéndose una colección perirrenal o en el trayecto hasta vejiga, y mediante estudio isotópico fuera del uréter. El tratamiento consistirá generalmente en exploración quirúrgica, practicándose extirpación de uréter necrosado y reimplante del resto a vejiga, o bien realizando anastomosis pielo-piélica con vía excretora ipsilateral del receptor si existe necrosis total del uréter. Si la fístula es pequeña, en ocasiones se puede esperar el cierre espontáneo, manteniendo la sonda vesical para conseguir un buen drenaje.

• Obstrucción ureteral

La obstrucción aguda del uréter en el postrasplante inmediato puede ser debida a coágulo de sangre, edema de mucosa, isquemia ureteral distal o total, trastornos de inserción de uréter en vejiga y, ocasionalmente, a hematoma o linfocele que comprimen el uréter⁵. Se caracteriza por oliguria o anuria y se diagnostica por ecografía (hidronefrosis), estudio isotópico y pielografía anterógrada (ausencia de paso del contraste a vejiga). El tratamiento consiste en dilatación con balón a través de nefrostomía, y se realiza intervención quirúrgica si fracasa lo anterior. Las obstrucciones tardías pueden ser debidas a fibrosis periureteral y litiasis renal. Las litiasis han sido publicadas con una

incidencia del 1%-2%, siendo debidas a complicaciones urológicas y a presencia de hipercalcemia, hiperoxaluria, etc. y, en ocasiones, a la presencia de cálculos en el riñón del donante.

- **Reflujo vésico-ureteral**

Se presenta con una incidencia del 4%-65%, dependiendo de las técnicas antirreflujo realizadas. Su presencia no ha ido acompañada de mayor incidencia de infección del tracto urinario.

II. Complicaciones infecciosas

Más del 80% de receptores de trasplante sufre, al menos, un episodio infeccioso durante el primer año postrasplante. Las infecciones más frecuentes son: vírica (50%), bacteriana (30%) y fúngica (3%). Es útil dividir el período postrasplante en tres etapas^{4,14}:

Primer mes postrasplante: Se puede considerar en este período tres tipos de infección.

- Infecciones asintomáticas presentes en el receptor, exacerbadas por el acto quirúrgico, que se hacen evidentes en el momento de iniciar el tratamiento inmunosupresor, como por ejemplo el tuberculosis. El diagnóstico de una infección activa es una contraindicación absoluta para el trasplante. Por lo tanto, es imprescindible el diagnóstico precoz y tratamiento eficaz de estas infecciones.
- Las infecciones transmitidas a partir de un injerto contaminado. Es importante que el donante sea evaluado para descartar tanto infecciones agudas como crónicas. El diagnóstico de infecciones virales como las del VIH y el VHB contraindica el trasplante.
- Durante este período, más del 95% son infecciones bacterianas o fúngicas de la herida, neumonías postoperatorias o infecciones relacionadas con las vías intravenosas o sondaje vesical. La infección del tracto urinario es la causa más frecuente de infección bacteriana

después del trasplante con una incidencia del 35%-79%, y está relacionada con la sonda, técnica quirúrgica y la inmunosupresión.

Período entre primer y sexto mes: Durante este tiempo ocurren las enfermedades infecciosas más serias, debido al máximo efecto del tratamiento inmunosupresor. Las causas más frecuentes son las infecciones víricas, siendo la infección por citomegalovirus la responsable de dos tercios de los episodios febriles durante este período. Este, a su vez, produce mayor inmunosupresión, que conlleva al desarrollo de infecciones oportunistas (*Pneumocystis carinii*, *listeria monocitogenes*, *Aspergillus*, *Toxoplasma*). Se ha comprobado que la infección por virus herpes induce un estímulo de la síntesis de citocinas y factores de crecimiento responsables a su vez de modular la expresividad de ciertos antígenos de histocompatibilidad sobre el órgano trasplantado, lo cual puede favorecer la aparición de rechazo y contribuir a potenciar la inmunodepresión.

Más de seis meses postrasplante: En pacientes con riñón normofuncionantes (75%), las infecciones son similares a las de la población general (infecciones urinarias, neumonías neumocócicas, etc.). En pacientes con infección vírica crónica por citomegalovirus, hepatitis B o C, etc. (10%-15%), la medicación inmunosupresora estimula la proliferación de estos virus, por lo que el organismo no erradicará dichas infecciones. Finalmente, el 5%-15% de pacientes presenta mala función renal (creatinina > 2,7 mg/dl), historia de rechazo agudo o crónico, y excesiva cantidad de medicación inmunosupresora, por lo que tendrán mayor riesgo de infecciones oportunistas.

III. Complicaciones cardiovasculares

La enfermedad cardiovascular es la principal causa de morbilidad y mortalidad después del trasplante renal. Se debe sobre todo al trasplante de individuos mayores, diabéticos, y a la mayor supervivencia del injerto. Existe una serie de factores que predisponen a dichas complicaciones:

• Hipertensión arterial

La existencia de hipertensión anterior al trasplante o el desarrollo de ésta después del mismo contribuyen a acelerar la enfermedad vascular y empeorar la función renal. La etiología es múltiple, dependiendo unas veces del receptor: hipertensión esencial, riñones propios, y otras del riñón trasplantado: rechazo, glomerulonefritis, estenosis de la arteria renal, y finalmente del tratamiento inmunosupresor: prednisona y CsA.

• Estenosis de la arteria renal

Tiene una incidencia del 2%-5%, y se puede localizar en el lugar de la anastomosis o a lo largo de la arteria renal (fig. 4). Las causas que predisponen a la misma son problemas técnicos o por fibrosis a nivel de la anastomosis, arterioesclerosis y acodamiento de la arteria renal. La principal consecuencia de la misma es el desarrollo de hipertensión arterial y a veces empeoramiento de la función renal. Un aumento de urea y creatinina después del tratamiento con inhibidores de la enzima de conversión de la angiotensina nos debe hacer sospechar la existencia de dicha patología. El diagnóstico se realiza mediante arteriografía renal y el tratamiento consiste en la realización de angioplastia transluminal percutánea, técnica que consigue buenos resultados, sin tener que hacer en la mayoría de los casos tratamiento quirúrgico.

La hiperlipidemia e hiperglucemia se relacionan generalmente con la utilización de prednisona y CsA y son factores importantes en el desarrollo de complicaciones cardiovasculares.

IV. Complicaciones digestivas

Dentro de las complicaciones digestivas después del trasplante, pueden presentarse hemorragias en pacientes con o sin historia antigua de úlcera; el estrés y el uso de esteroides son factores predisponentes. Las perforaciones del intestino delgado y

grueso, infrecuentes pero muy serias, son debidas sobre todo a diverticulitis, isquemia, yatrogenia o a impactación fecal⁵. El uso de prednisona y CsA predisponen a una mayor incidencia de pancreatitis.

La afectación hepática en los pacientes con trasplante renal se presenta entre el 9%-34%. Las causas más frecuentes de la misma son: infecciones víricas (hepatitis B, C y citomegalovirus), lesiones tóxicas (azatioprina, CsA, metildopa) y hemosiderosis en pacientes que hayan requerido múltiples transfusiones sanguíneas durante el período en diálisis.

V. Complicaciones tumorales

Hoy es bien conocida la mayor incidencia de tumores en pacientes tratados con inmunosupresores^{4,5}. Presentan una incidencia del 5%-6%, si bien existen grandes variaciones geográficas, dependiendo sobre todo de la mayor o menor exposición al sol. Entre los factores predisponentes están: depresión del sistema inmune, estimulación antigénica crónica en presencia de inmunosupresión, mayor susceptibilidad a infección por virus oncogénicos, acción neoplásica directa de los fármacos inmunosupresores, así como la exposición al sol. Los tumores aparecidos después del trasplante son, predominantemente, de origen epitelial y linfoproliferativo. Los cánceres más frecuentes son los de piel, sobre todo carcinoma de células escamosas, seguidos de linfomas, sarcoma de Kaposi, carcinoma renal, carcinoma de cervix, etc. Es preciso, por tanto, evitar exposiciones prolongadas al sol, realización de exámenes físicos cuidadosos y biopsias de las lesiones sugestivas de neoplasia. En los tumores agresivos estará indicado disminuir o suspender el tratamiento inmunosupresor.

VI. Otras complicaciones

- **Trastornos hematológicos** como la aplasia medular pueden ser desencadenados por azatioprina. La CsA puede causar anemia hemolítica en asociación con síndrome hemolítico urémico. La eritrocitosis (HCT>52%) puede verse en el primer año después del trasplante, pudiendo estar asociado con buena función renal, rechazo crónico, o estenosis de la arteria renal.

- **Complicaciones óseas:** La osteoporosis y necrosis ósea avascular han disminuido significativamente con el uso de menores dosis de corticoides⁵. En los primeros momentos después del trasplante se producen pérdidas renales de bicarbonato y fósforo debidas sobre todo a disfunción tubular proximal, requiriéndose aporte oral de fósforo.

- **La hipercalcemia** puede ocurrir en pacientes con hiperparatiroidismo severo, resolviéndose habitualmente en el primer año postrasplante. De no ocurrir así, precisará paratiroidectomía.

El 5%-10% de los trasplantados desarrollarán diabetes, generalmente debido al efecto hiperglucemiante de esteroides y CsA.

1.A.9. Resultados del trasplante renal

En los inicios del trasplante, cuando aún no se conocían bien los fármacos inmunosupresores, los resultados del mismo eran desalentadores, pues fallecía la mayoría de los pacientes por problemas infecciosos relacionados con excesiva inmunosupresión. Con el mayor conocimiento de la técnica quirúrgica, mejores cuidados clínicos, y mejor uso y conocimiento del tratamiento inmunosupresor como introducción de la CsA y uso de dosis menores de corticoides, ha mejorado ostensiblemente la supervivencia del injerto

y del paciente. La supervivencia del paciente con trasplante renal de cadáver es del 96% en el primer año y del 85% a los cinco años. Durante el primer año postrasplante, la principal causa de pérdida del injerto es el rechazo agudo. Las complicaciones cardiovasculares son actualmente las principales causas de morbilidad y mortalidad del trasplante renal, habiendo desplazado a las complicaciones infecciosas⁵.

1.B. Familia *Herpesviridae*

1.B.1. Sistemática

La familia herpesviridae incluye alrededor de 100 virus diferentes, entre los que solamente un pequeño número es capaz de infectar al hombre.

El Comité Internacional para la Nomenclatura de los virus (ICNV) establece en 1970 las características de los virus del grupo herpes con criptograma D/2; 54-92/7, S/S; V/0:

- ADN bicatenario, con un peso molecular (PM) de $54-150 \times 10^6$ Daltons
- Índice G + C = 57% - 74%
- El diámetro aproximado del virión está comprendido en un rango de 100-150 nanómetros (nm).
- Cápside de simetría icosaédrica y compuesta invariablemente por un total de 162 capsómeros.
- Cubierta de naturaleza lipídica.
- Replicación inicial en el núcleo de la célula huésped y síntesis de proteínas estructurales en el citoplasma.
- Inclusiones intranucleares características.
- Son virus que no necesitan de un artrópodo vector para su transmisión.

Posteriormente el grupo encargado del estudio de los virus herpes propone al ICNV que se designe a cada miembro de dicha familia con un número, según la

numeración arábica (Roizman, 1973).

La clasificación de los virus herpes sería la siguiente:

Herpesvirus humano 1 = Virus del Herpes simple tipo 1 (VHS-1)

Herpesvirus humano 2 = Virus del Herpes simple tipo 2 (VHS-2)

Herpesvirus humano 3 = Virus de la Varicela Zoster (VVZ)

Herpesvirus humano 4 = Virus del Epstein-Barr (VEB)

Herpesvirus humano 5 = Citomegalovirus (CMV)

Herpesvirus humano 6 = Herpes virus 6 (HVH6)

Herpesvirus humano 7 = Herpes virus 7 (HVH7)

Herpesvirus humano 8 = Herpes virus 8 (HVH8)

Aunque los virus HVH6, HVH7 y HVH8 han sido aislados con posterioridad a esta clasificación, han seguido la nomenclatura adoptada por el ICNV.

Basándose en propiedades biológicas, el ICNV divide en 1979 a la familia Herpesviridae en tres subfamilias: alphaherpesvirinae, betaherpesvirinae y gammaherpesvirinae, a las que se han ido incorporando, progresivamente, los nuevos virus herpes descubiertos según sus características morfológicas, replicativas, etc.

• **Subfamilia *Alphaherpesvirinae***

- Células huésped: variedad muy amplia tanto in vivo como in vitro.
- Ciclo reproductivo: corto.
- Infecciones latentes: frecuentes en células nerviosas.
- Dentro de esta subfamilia se agrupan:

Herpesvirus humano 1 = Virus del Herpes simple tipo 1 (VHS-1)

Herpesvirus humano 2 = Virus del herpes simple tipo 2 (VHS-2)

Herpesvirus humano 3 = Virus de la Varicella Zoster (VVZ)

• **Subfamilia *Betaherpesvirinae***

- Células huésped: in vivo la variedad es muy extensa, in vitro casi exclusivamente fibroblastos.
- Ciclo reproductivo: largo
- Infecciones latentes: en células de glándula secretora, linforreticulares, renales y otros tejidos.
- A esta subfamilia pertenecen:

Herpesvirus humano 5 = Citomegalovirus (CMV)

Herpesvirus humano 6 = Herpes virus 6 (HVH6)

Herpesvirus humano 7 = Herpes virus 7 (HVH7)

• **Subfamilia *Gammaherpesvirinae***

- Células huésped: in vivo, células epiteliales y linfáticas. In vitro, células linfáticas, epiteliales y fibroblasto.
- Ciclo reproductivo: variable.
- Infección latente: tejido linfático.
- En esta subfamilia se encuadra:

Herpesvirus humano 4 = Virus del Epstein-Barr (VEB)

Herpesvirus humano 8 = Herpes virus 8 (HVH-8)

Estas divisiones, adoptadas por el ICNV, fueron confirmadas por el grupo para el estudio de los virus herpes (1981), con las posteriores inclusiones de los virus HVH6, HVH7 y HVH8 en las mismas.

1.B.2. Estructura

Un estudio detallado de la estructura de estos virus nos permite observar que se trata de una partícula esférica de 150-200 nm de diámetro con cuatro elementos estructurales¹⁵:

- Core opaco a los electrones.
- Cápside icosaédrica de 100-120 nm de diámetro con 162 capsómeros. Estos pueden ser triangulares, pentámeros y hexámeros, distribuidos de forma regular.
- Una matriz o tegumento amorfo que rodea la cápside, y que está constituido por un número variable de proteínas que constituyen un material poco estructurado.
- Envuelta externa de naturaleza lipídica con espículas glicoproteicas en su superficie codificadas por el propio virus y que suelen estar implicadas en la adsorción del virus a la superficie de la célula.

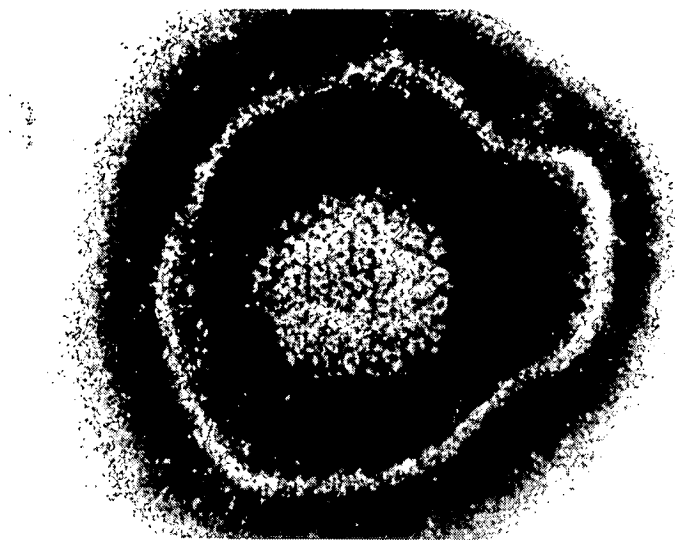


Figura 1.

Estructura de un virus herpes visualizado mediante microscopio electrónico.

1.B.3. Genoma de los virus herpes

Se trata de ADN de doble cadena con un tamaño y un contenido en G+C variable:

- **VHS**

- ADN de doble cadena de unos 150 kpb.
- Contenido de G+C: 68 en VHS-1 y 69% en VHS-2.
- Codifica para más de 70 proteínas, 33 de las cuales son estructurales¹⁵.

- **VVZ**

- ADN de doble cadena de unos 125 kpb.
- Contenido de G+C del 46%.
- Codifica para más de 30 proteínas virales (PM de 5-200 kD)¹⁵.

- **VEB**

- ADN de doble cadena de unos 172 kpb.
- Codifica para unas 100 proteínas de un tamaño medio¹⁵.

- **CMV**

- ADN de doble cadena de unos 230-240 kpb.
- Contenido de G+C: 57%.
- Codifica para unas 200 proteínas¹⁵.

- **HVH6**

- ADN de doble cadena de unos 160-170 kpb.
- Contenido de G+C: 43%.
- Codifica para unas 100 proteínas¹⁶.

El genoma de HVH-7 presenta una gran homología con HVH-6¹⁷ y el de HVH-8 con VEB¹⁸.

1.B.4. Replicación

Todavía se desconoce mucho del ciclo replicativo de los virus herpes, sobre todo en cuanto a las proteínas que intervienen en cada uno de los pasos del mismo, y especialmente en el caso de los nuevos virus herpes (HVH-6, HVH-7 y HVH-8)¹⁵.

El ciclo reproductivo en los virus herpes es corto para la subfamilia alphaherpesvirinae, largo para la subfamilia betaherpesvirinae y variable para la subfamilia gammaherpesvirinae.

Con las variaciones propias de cada uno de los virus herpes, el ciclo reproductivo, en líneas generales, se compone de los siguientes pasos¹⁵:

- Contacto inicial y penetración en la célula huésped mediado por espículas de glicoproteínas en la superficie de la envuelta viral. Estas glicoproteínas reconocen un “receptor” en la superficie de la célula. Además, existirán distintos procesos morfológicos, bioquímicos y fisiológicos que contribuirán a la vulnerabilidad selectiva que ofrece la infección por estos virus herpes.
- Tras este contacto inicial se produce la fusión, por lo que tiene lugar la entrada de las proteínas del tegumento y la nucleocápside en el citoplasma.
- En este momento se detienen distintos procesos celulares: síntesis de ADN, síntesis proteica, síntesis de ARN ribosomal, glicosilación, etc, gracias a la acción de las proteínas del tegumento.
- A continuación, la nucleocápside es transportada desde el citoplasma al interior del núcleo por medio del citoesqueleto.

- Al llegar a los poros del núcleo, la cápside se degrada y el ADN se introduce en el interior del núcleo donde inmediatamente se circulariza.
- Se produce la transcripción de los genes virales tempranos gracias a la ARN polimerasa II del hospedador. La expresión de los genes virales se regula de forma coordinada y está ordenada secuencialmente en una cascada (genes tempranos → genes medios → genes tardíos).
- De esta forma se produce la síntesis de las proteínas necesarias para la replicación del ADN viral y de las proteínas que constituyen la nucleocápside. Las proteínas del tegumento una vez sintetizadas, migran a la superficie del núcleo. En cuanto a las glicoproteínas, son modificadas post-traduccionalmente en el Aparato de Golgi, y de allí son transportadas a la superficie del núcleo y de otras membranas celulares.
- El ensamblaje del ADN y de la cápside se produce en el interior del núcleo.
- Las nucleocápsides maduras atraviesan la membrana nuclear por los puntos donde se encuentran las proteínas y adquieren de este modo las proteínas del tegumento y de la envoltura.
- Igualmente al salir de la célula huésped, los viriones arrastran parte de la membrana citoplásmica que pasa a ser la envoltura de estos virus.
- La infección productiva da lugar a la destrucción de la célula huésped.

1.B.5. Patogenia

Van a existir diferencias entre los distintos virus herpes en cuanto a los lugares donde tienen lugar la infección primaria y los lugares donde establecen un estado de latencia.

- **VHS**

- Hay que distinguir entre:
 - VHS-1, que suele infectar en los primeros años de la vida, y
 - VHS-2, que suele infectar al inicio de la actividad sexual.
- Infección primaria en células cutáneomucosas.
- La mayoría de las infecciones primarias cursan casi siempre de forma inaparente.
- Migración a través de los axones de los nervios sensitivos, hasta alcanzar el núcleo de las neuronas del ganglio sensitivo que inerva al dermatoma infectado:
 - Ganglio trigémino para VHS-1, y
 - Ganglios sacros en la región genital para VHS-2.
- Algunas de estas neuronas son infectadas masivamente y acaban lisándose; sin embargo, en la mayoría, el VHS se instaura en forma de infección latente.
- La reactivación puede deberse a estímulos muy diferentes: el estrés, la luz ultravioleta, la fiebre, estímulos hormonales, traumatismos o inmunodepresión.

- Se transmite por contacto directo persona –persona:
 - VHS-1 se elimina fundamentalmente a través de la saliva, aunque la autoinoculación a partir de otras lesiones es posible, y
 - VHS-2 se transmite preferentemente por contacto sexual¹⁵.

• VVZ

- La primoinfección se manifiesta generalmente en la infancia como un cuadro de Varicela. La reactivación como un herpes zóster.
- Penetra por vía respiratoria y se replica inicialmente en la mucosa del tracto respiratorio y la orofaringe.
- La diseminación se produce por vía linfática y hematógena, multiplicándose el virus en los leucocitos mononucleares y en las células del endotelio capilar.
- Posteriormente establece una infección latente en los ganglios tras acceder a ellos por vía axonal, a través de los nervios sensitivos. El virus también puede alcanzar dicha localización durante la diseminación hematógena.
- El virus se disemina por vía respiratoria y se necesita un contacto muy próximo para que la transmisión sea posible¹⁵.

• VEB

- La primoinfección se manifiesta como un cuadro de mononucleosis infecciosa de anticuerpos heterófilos positivos.
- Durante la primoinfección el virus se multiplica activamente en las células epiteliales de la orofaringe, infectando más tarde a los linfocitos B locales.

- Una parte de los linfocitos B infectados se immortalizan por expresión anómala, en las células transformadas. El huésped elimina estas células por medio de células NK y CD8 supresoras específicas y, más tarde, de células CD8 citotóxicas. Sin embargo, es posible que una pequeña parte de los linfocitos no sean destruidas, constituyendo un reservorio del virus latente.
- Suele transmitirse a través de la saliva, incluso en individuos sanos, requiriéndose un contacto íntimo. Puede transmitirse también por vía sexual o sanguínea¹⁵.

• CMV

- Infecta un amplio espectro de células humanas diferenciadas y diploides.
- Se comporta como poco patógeno en el huésped inmunocompetente; sin embargo, su virulencia es extraordinaria en inmunodeprimidos.
- La primoinfección puede adquirirse por vía parenteral, oral o sexual (en los dos últimos casos el virus se multiplica en el lugar de infección, tanto en células epiteliales como en fibroblastos).
- A partir del lugar de la infección, accede a la circulación (viremia) donde puede infectar células sanguíneas (linfocitos y monocitos). La diseminación a diferentes órganos se produce posteriormente.
- En el control de la primoinfección parecen tener relevancia los anticuerpos neutralizantes, las células efectoras NK y las células CD8 específicas, aunque ninguno de ellos consigue eliminar el virus del organismo, donde permanece en estado de infección latente.

- Establece una infección persistente de bajo nivel replicativo en las glándulas salivares y en el riñón, pero no puede descartarse que se produzca en otros órganos. Al mismo tiempo, se establece una infección latente en diferentes células de varios órganos (bazo, pulmón) e incluso en sangre periférica.
- Puede reactivarse a partir de los lugares de latencia dependiendo de la eficacia de la respuesta del sistema inmune.
- El contagio se efectúa por contacto con líquidos o secreciones por vía oral, respiratoria, sexual, sanguínea y vertical¹⁵.

• VHV-6

- Infecta un amplio espectro de células humanas: linfocitos, macrófagos y monocitos, células endoteliales del hígado, células de glándulas salivares y de tejidos del SNC (aquí los productos de los genes virales se han localizado en las neuronas y en los oligodendrocitos).
- El SNC parece ser un reservorio de este virus¹⁶.

• HVH-7

- Es un virus recientemente descubierto a partir de linfocitos de sangre periférica¹⁹. Presenta tropismo celular por células T con marcadores CD2, CD3, CD4, CD7 y en menor medida CD8²⁰.

• HHV-8

- Es el agente etiológico del sarcoma de Kaposi²¹.
- Tiene neurotropismo y SNC parece ser un reservorio de este virus²².

1.B.6. Epidemiología

Los virus herpes son agentes ubicuos que normalmente infectan a la población en los primeros años de la vida. Esto hace que en la mayoría de los estudios seroepidemiológicos realizados con estos virus, la casi totalidad de la población tenga anticuerpos contra estos virus. Por ello, se suele decir que tienen una distribución universal¹⁵.

Además, todos los estudios relacionan la prevalencia de la infección con el nivel socioeconómico: cuanto más bajo sea el nivel socioeconómico, la prevalencia será más elevada, y al contrario, a mayor nivel socioeconómico, la prevalencia será más baja.

Para todos los virus herpes incluidos en este estudio, existe transmisión vertical materno-fetal y el ser humano es el único reservorio conocido.

1.B.7. Manifestaciones clínicas

Las infecciones por virus herpes pueden presentarse clínicamente de diversas formas, según la localización, el tipo del huésped y si se trata de infecciones primarias o recurrentes.

Debido al estado de inmunodepresión que se da en el trasplante renal, hace que el paciente esté en una situación de predisposición para padecer infecciones por estos virus. Entre las infecciones más comunes tenemos las siguientes¹⁵:

- **VHS**

- VHS-1 es un herpes cutáneomucoso implicado generalmente en lesiones situadas de diafragma hacia arriba; VHS-2 está implicado normalmente en lesiones localizadas de diafragma hacia abajo.

- Excepcionalmente, pueden tener otras manifestaciones: en el SNC.
- Encefalitis: El VHS es la causa más frecuente de encefalitis esporádica. El virus puede diseminarse al cerebro durante la infección primaria o en las recurrencias.
- Herpes neonatal, que puede presentarse como una encefalitis.
- Infecciones orofaríngeas, cutáneas, ocular, genital,...

• VVZ

- La primoinfección cursa como un cuadro de varicela y la reactivación como un herpes zóster:

Varicela. Entre las complicaciones que pueden presentarse y que afectan al SNC están: encefalitis, meningitis.

Herpes zóster. Entre las complicaciones que pueden afectar al SNC:

- Neuralgia. Afecta a más de un 10%.
- Encefalitis. Es bastante rara.

• VEB

- Aunque la primoinfección es habitualmente asintomática, puede producir varios cuadros clínicos:

- Mononucleosis infecciosa.

La primoinfección suele cursar como un cuadro de mononucleosis infecciosa de anticuerpos heterófilos positivos. Puede presentar complicaciones neurológicas que implican: Meningitis encefalitis y síndrome de Guillain-Barré.

- Enfermedad de Hodgkin.
- Infección crónica-persistente por VEB. Tras una mononucleosis infecciosa. Puede provocar alteraciones neurológicas.
- Neoplasias:
 - Linfoma de Burkitt endémico (africano).
 - Carcinoma nasofaríngeo.
 - Síndromes linfoproliferativos y linfomas inmunoblásticos.

• CMV

- En el paciente inmunocompetente: La primoinfección puede cursar como un cuadro de mononucleosis infecciosa de anticuerpos heterófilos negativos. Como secuelas pueden aparecer: síndrome de Guillain-Barré, meningoencefalitis, etc.
- La infección congénita: CMV es la primera causa de infección transplacentaria que se conoce.
- La infección perinatal: Es menos grave.
- Infección en el paciente inmunodeprimido: Suele producirse en un paciente, previamente infectado por CMV, cuya infección se reactiva por la inmunodepresión, tratamiento tras un trasplante de órgano, tratamiento inmunodepresor ante un proceso oncogénico e inmunodepresión *per se* en los enfermos de SIDA.

• HVH-6

- La primoinfección en el niño suele cursar como un cuadro de *roseola infantum*.
- Puede infectar células de origen neural in vitro e invadir el SNC durante la infección primaria, lo que sugiere que el virus puede jugar un papel importante en enfermedades del cerebro y de la médula espinal: Se ha demostrado su presencia en muchos casos de meningitis y encefalitis.
- Otras manifestaciones: En pacientes inmunocomprometidos, por trasplantes y SIDA. Neoplasias. Se relaciona con el Síndrome de fatiga crónica.

• HVH-7

- No se conoce su asociación clara con síndrome alguno, aunque se ha implicado: Como agente causante del *exantema súbito* (formas que se producirían en edades más tardías y serían más leves). Con síndromes similares al resfriado común y en síndromes febriles inespecíficos.
- Se trata de un virus todavía en fase de investigación.

• HVH-8

- Es el agente patológico del Sarcoma de Kaposi²¹.
- Se ha vinculado con otras enfermedades linfoproliferativas benignas.
- Se ha relacionado con la enfermedad Castleman.
- Se ha sido asociado con encefalitis en individuos inmunocomprometidos.

1.B.8. Diagnóstico

Debe tenerse en cuenta que la eliminación asintomática es posible y, por tanto, el aislamiento del virus a partir de las lesiones no siempre tiene significación clínica (no ocurre lo mismo con VVZ que no se excreta de forma asintomática en pacientes en los que se encuentran en estado latente y, por tanto, la demostración de su presencia en tejidos afectados es diagnóstica).

• Métodos directos

- Aislamiento en cultivo celular. Es la técnica de referencia, pero también es el método menos sensible. Para HHV-6 es técnicamente complejo y no se recomienda en el diagnóstico habitual.

Existen variantes: 1) Tradicional, y 2) Por centrifugación o *shell-vial* (técnica más rápida)²³.

- Detección directa de antígenos virales (proteínas virales), con anticuerpos monoclonales comercializados, mediante: inmunofluorescencia directa (IFD), inmunoperoxidasa,...

- Detección del genoma viral mediante:

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Es el método más sensible y específico. Existen distintas variantes: 1) Convencional (cualitativa o cuantitativa), 2) Anidada, doble o nested, y 3) RT-PCR: amplificación del ARN (total, mensajero, ribosómico,...).

Hibridación *in situ* con sondas específicas.

Southern-blot.

- Detección de proteínas mediante western blot.

- **Métodos indirectos**

- Serología: Demostración de la presencia de anticuerpos específicos por las técnicas de fijación del complemento, neutralización, inhibición de la hemaglutinación, radioinmunoanálisis, inmunofluorescencia indirecta (IFI), enzimoimmunoensayo (ELISA), aglutinación pasiva con partículas de látex,...

La detección de seroconversión o detección de un aumento de 4 veces de los títulos de anticuerpos entre dos muestras tomadas con un intervalo de unos 15 días tiene valor diagnóstico.

La detección de IgM específicas puede ser útil en el diagnóstico de las infecciones primarias, aunque esta prueba presenta el inconveniente de la larga vida media de estas inmunoglobulinas.

No es útil para el diagnóstico de las recurrencias, ya que éstas no suelen ir asociadas con cambios detectables en el nivel de anticuerpos ni en la producción de IgM.

- Otros:

Para VEB: detección de anticuerpos heterófilos por aglutinación (Paul-Bunnell-Davidson). Son anticuerpos de la clase M que aparecen en distintas enfermedades, e incluso en personas sanas (anticuerpos de Forsmann).

1.B.9. Tratamiento

Existe en la actualidad una gran variedad de posibles tratamientos con los que poder combatir la infección por virus herpes. Los más importantes son:

- **Ganciclovir**

- 9-2-hidroxi-1-hidroximetiletoximetilguanina. Nucleósido análogo de guanina, su forma activa (trifosfatada) inhibe la ADN polimerasa deteniendo la elongación de la cadena de ADN. Su tolerancia es relativamente buena; los efectos secundarios más frecuentemente descritos han sido trombocitopenia y granulocitopenia.
- Su principal desventaja radica en la aparición de cepas resistentes, probablemente debido a una incapacidad de dichas cepas de inducir la fosforilación del ganciclovir en las células infectadas²⁴.
- La eficacia es variable, en función de la patología.
- Se administra por vía intravenosa y oral.

- **Aciclovir**

- 9-2-hidroxi-1-hidroximetilguanina. En su forma activa (aciclovir trifosfato), inhibe la ADN-polimerasa.
- Su uso está recomendado para el tratamiento de VHS-1 y VHS-2.
- Existe una gran diversidad de formas de administración.
- Ha sido el primer antivírico no tóxico para la célula infectada ya que ataca directamente a la ADN polimerasa viral.

- **Famciclovir**

- Su estructura se asemeja al aciclovir y al ganciclovir.
- Tiene una buena absorción oral. Su uso está autorizado para el tratamiento del herpes zóster agudo, ya que tiene un efecto significativamente más rápido en la eliminación del dolor que el aciclovir.

- **Foscarnet**

- Ácido fosfonomórfico. Inhibe directamente la ADN polimerasa de los miembros de la familia *Herpesviridae*.
- Destaca por su nefrotoxicidad, debida a la formación de depósitos de calcio.
- Se administra por vía intravenosa.

- **Idoxuridina**

- Análogo de nucleósidos. Es altamente tóxico.
- Sólo puede utilizarse por vía cutánea.

- **Vidarabina**

- Análogo de nucleósidos. La vidarabina vía sistémica ha demostrado también eficacia en la encefalitis herpética y el herpes neonatal.
- Es altamente tóxico para la célula infectada pues ataca tanto la ADN polimerasa viral como la ADN polimerasa celular.
- Actualmente está en desuso.

1.B.10. Prevención

No se dispone de vacunas eficaces que nos puedan prevenir de la infección por estos virus, tan sólo para VVZ existe actualmente una vacuna de virus atenuado (OKA), que es eficaz en la prevención de la varicela, particularmente en niños sanos. Su eficacia en niños inmunodeprimidos y adultos es inferior, y además presentan mayor riesgo de efectos secundarios, por lo que su aplicación debe estudiarse individualmente en cada caso.

Se dispone de una vacuna de virus atenuado para CMV no comercializado todavía, de eficacia parcial, que no evita la reactivación o la instauración de una infección persistente²⁵.

Se recomienda evitar el contacto íntimo y prolongado con personas infectadas “eliminadoras” de virus.

1.C. Técnicas para la detección de ácidos nucleicos

Se trata de técnicas basadas en la hibridación del ADN de la célula infectada con el ADN (ó ARN) viral marcado, que recibe el nombre de sonda. El conocimiento de las secuencias de los virus herpes ha permitido el diseño de sondas específicas que permiten detectar la presencia de genes o regiones concretas del genoma del virus en muestras clínicas. El marcaje de dichas sondas puede ser isotópico o pueden emplearse moléculas detectables por reacciones enzimáticas (digoxigenina, biotina, etc).

Las más importantes de estas técnicas son: dot-blot, southern-blot, hibridación in situ y reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

1.C.1. Dot-blot

El ADN extraído de la muestra es desnaturalizado y fijado a una membrana de nylon o nitrocelulosa. A continuación se procede a su hibridación con una sonda específica marcada²⁶. A pesar de ser un método relativamente sencillo, presenta varias desventajas: Favorece hibridaciones inespecíficas y la aparición de ruido de fondo, y su sensibilidad es relativamente baja (no excede de las 50 copias / célula), por lo que las muestras que contienen pequeñas cantidades de virus suelen dar resultados de falsos negativos.

1.C.2. Southern blot

Tras la extracción del ADN de la muestra, éste es sometido a la acción de enzimas de restricción; a continuación, los fragmentos obtenidos se separan mediante electroforesis en gel de agarosa y se transfieren a una membrana de nitrocelulosa. Dicha membrana es sometida entonces a hibridación siguiendo el mismo protocolo que se utiliza en el dot-blot²⁷.

A pesar de que el southern blot ofrece una información más específica y detallada para el diagnóstico clínico de la infección por virus herpes que el dot-blot, lo complicado de su ejecución impide que se emplee como método de diagnóstico rutinario en la detección clínica de estos virus.

1.C.3. Hibridación in situ

La hibridación con la sonda marcada se realiza directamente sobre un porta en el que previamente se han fijado las células o tejidos a estudiar.

Aunque preserva la morfología tisular, permitiendo la localización exacta del genoma viral incluso en cortes de tejidos conservados en parafina, su sensibilidad es baja (de 20 a 50 copias por célula, dependiendo del tipo de marcaje empleado). Se utiliza fundamentalmente en laboratorios de anatomía patológica y citología.

1.C.4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Es una técnica sensible y específica. Es la más reciente de las técnicas de detección de ácidos nucleicos²⁸. Consiste en la amplificación de secuencias específicas de ADN mediante ciclos repetitivos de desnaturalización-apareamiento de iniciadores específicos-elongación. Las elevadas temperaturas a las que transcurren dichos procesos (entre 40°C-95°C) hacen que la ADN polimerasa responsable de esta amplificación deba ser termoestable; la más frecuentemente utilizada es la denominada Taq polimerasa, aislada de una bacteria termófila (*thermus acuaticus*) y dependiente de iones Mg^{2+} . Además de esta polimerasa y la muestra, esta reacción precisa de nucleótidos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), iniciadores específicamente diseñados en cada paso para amplificar la secuencia de interés, y un tampón que contenga una concentración adecuada de sales y electrolitos para que la PCR tenga lugar en condiciones óptimas. Al término de los ciclos de PCR, el fragmento específico de ADN puede haberse amplificado hasta un millón de veces. Finalmente, dicho ADN amplificado es identificado mediante electroforesis en gel de agarosa y subsiguiente hibridación.

La técnica de PCR ofrece por tanto importantes ventajas: rapidez, simplicidad, elevada efectividad y sobre todo su enorme sensibilidad y especificidad, lo cual la convierte en uno de los mejores métodos para la detección de virus herpes en prácticamente cualquier tipo de muestra clínica. De hecho, hasta el momento, ha

permitido la detección de virus herpes en muestra tales como orina, sangre periférica, tejido pulmonar, tejido de paredes arteriales, células cervicovaginales, líquido cefalorraquídeo, etc.

En la actualidad la técnica de PCR nos ofrece distintas posibilidades, como son:

- PCR convencional: Sería la anteriormente descrita. Puede ser cualitativa (nos indica presencia o ausencia del fragmento amplificado) o cuantitativa (nos indica el número total de copias del fragmento amplificado presentes en el tubo de reacción).
- PCR anidada, doble o nested PCR: Se realizarán dos rondas de amplificaciones. La primera, sería como una PCR convencional; en la segunda, se utilizan una segunda pareja de iniciadores que amplificarían una parte del fragmento anteriormente amplificado, de ahí que a estos iniciadores se les denomina internos. El resto de componentes de la mezcla de reacción sería idéntico al anteriormente expuesto.
- RT-PCR: Consiste en la amplificación, del modo anteriormente descrito, del ADN complementario (ADNc) obtenido a partir de la retrotranscripción de un fragmento de ARN mensajero (ARNm), ARN ribosomal (ARNr) o ARN total. Por lo tanto, lo que estaríamos amplificando, si bien indirectamente, sería un fragmento de ARN.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Como hemos visto en la introducción, uno de los problemas importantes que tienen los pacientes sometidos a trasplante renal, debido a la inmunodepresión que presentan, es la infección viral⁴, sobre todo por los virus herpes, que son una causa significativa de morbilidad y mortalidad en estos pacientes⁶. Los más frecuentemente implicados y estudiados son CMV, VEB y HVH-6. Unos por la alta incidencia de sus infecciones y la gravedad de las consecuencias, como es el caso de CMV^{29,30}, otros por los trastornos linfoproliferativos que pueden ocasionar, como en el caso de VEB³¹, y otros para profundizar en la patogenia de los virus de reciente aparición como el HVH-6³². Por esta razón, nos propusimos incluir estos tres virus en nuestro estudio.

Debido a la existencia de medidas de prevención⁶ y de tratamiento antiviral específico, uno de los objetivos en el trasplante renal sería el desarrollo de pruebas diagnósticas sensibles y específicas que permitan la detección rápida de estos virus.

Debido a que la infección por virus herpes puede producir síntomas similares, uno de nuestros objetivos era determinar que la causa del proceso infeccioso fuera debida a CMV, virus de Epstein-Barr y Herpesvirus 6. Esto requiere una prueba diagnóstica de alta sensibilidad, que como han demostrado la mayoría de los estudios, podría ser aportada por una técnica de detección-amplificación del genoma viral; por todo ello, hemos procedido a la realización de una técnica de reacción en cadena de la polimerasa anidada (PCR nested) para alcanzar una sensibilidad óptima y establecer así una comparación entre los resultados obtenidos. Como método de confirmación de los virus detectados,

utilizamos la técnica de hibridación con sonda específica para cada uno de los virus incluidos en este estudio.

La muestra de sangre total sólo permite la detección de la presencia de ADN viral, pero no diferencia entre infección latente e infección activa por replicación viral; por este motivo se analizaron también, en los mismos pacientes, las muestras de suero.

Por último, conviene señalar que las infecciones activas por CMV que cursan con una replicación de partículas víricas, no se acompañan siempre de la aparición de patología o enfermedad por CMV, siendo esta última el objetivo primordial del diagnóstico, por lo que hemos realizado la medición de la carga viral del CMV mediante una PCR cuantitativa a tiempo real, como una aproximación para objetivar una posible relación entre la cantidad de genoma viral presente y el desarrollo de la enfermedad por el virus implicado, así como establecer el momento adecuado para la instauración del tratamiento antiviral correspondiente.

Por todo ello, los objetivos del presente estudio fueron los siguientes:

1. El objetivo principal se centró en la determinación de las prevalencias de ADN de los tres virus herpes incluidos en nuestro estudio en un grupo de pacientes sometidos a trasplante renal. Para alcanzar esto, se analizó por PCR nested las muestras de sangre total y de suero de dichos pacientes y se compararon los resultados obtenidos con los proporcionados por una población control del mismo número de individuos, con las mismas características de edad y sexo que el grupo de enfermos.
2. Establecer la diferencia entre infección latente e infección activa con replicación viral, mediante la detección del genoma viral en el suero.

3. Determinar las posibles correlaciones que puedan existir, en caso de coinfección, entre los tres virus herpes estudiados.
4. Realizar un estudio comparativo de las técnicas utilizadas en el laboratorio para el diagnóstico de la infección por estos virus.
5. Determinar la sensibilidad, especificidad, valores predictivos y la razón de verosimilitud positiva y negativa de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa anidada (PCR *nested*), y la comparación de los mismos con los obtenidos por otras técnicas de diagnóstico.
6. Definir en el caso de CMV, mediante PCR cuantitativa, los puntos de corte óptimos de la carga viral que indican la presencia de infección por las distintas técnicas de diagnóstico utilizadas en el laboratorio para CMV, así como en relación a la presencia de síntomas que puedan acompañar esta infección.

MATERIAL Y MÉTODOS

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.A. Pacientes

El presente estudio ha abarcado un total de 67 pacientes constituido por 40 hombres (59,7%) y 27 mujeres (40,3%) que fueron sometidos a trasplante renal entre enero de 1999 y junio de 2000, procedentes del Servicio de Nefrología del Hospital Universitario San Carlos de Madrid. La edad media de los hombres era de 46,95 años (19-66) y la de las mujeres de 45,88 años (23-67). Desviación estándar: 12,9 años.

Con el fin de poder realizar un estudio comparativo de los resultados obtenidos, se estudiaron 67 personas, supuestamente sanas, todas ellas donantes de sangre del Hospital Universitario San Carlos de Madrid, que fueron utilizados como grupo control. A cada paciente incluido en el estudio, se le asignó un donante de sangre con idénticas características de edad y sexo.

3.B. Muestras

El tipo de muestra empleado ha sido sangre periférica y suero. En todos los casos se procedió a realizar una toma de 6 centímetros cúbicos (cc) de sangre periférica recogida en tubo estéril conteniendo EDTA como anticoagulante.

Tanto las muestras de sangre total como las de suero fueron almacenadas a - 70° C el mismo día de la extracción hasta el momento de su procesamiento por PCR.

Un total de 536 muestras de sangre e igual número de muestras de suero fueron recogidas con la siguiente periodicidad:

- 1^{er} mes postrasplante: la primera muestra se tomó al día siguiente del trasplante, y otras dos a intervalos regulares de dos semanas.
- 2° al 6° mes postrasplante: del 2° al 6° mes postrasplante se recogieron las muestras mensualmente.

3.C. Extracción del ADN de los leucocitos obtenidos de sangre total:

3.C.1. Reactivos

- STMT. Sacarosa 0'32 M (*Panreac*), Tris-HCl pH 7'5 1 mM (*Sigma*), $MgCl_2$ 5 mM (*Sigma*) Triton X-100 al 1% (*Sigma*) y agua hasta completar el volumen deseado.
- Solución B. NaCl 0'075 (*Sigma*), EDTA 0'024 M a pH 8 (*Sigma*) y agua hasta completar el volumen deseado.
- Solución C. Proteinasa K 20 mg/ml (*Sigma*) y SDS al 10% (*Biorad*).
- Proteinasa K 20 mg/ml.
- NaCl 6M.
- Isopropanol (*Merck*).
- TE. Tampón compuesto por 10 mM de Tris pH 7.5 y 1 mM de EDTA.

3.C.2. Extracción del ADN de leucocitos:

El protocolo del laboratorio seguido para la extracción del ADN de leucocitos a partir de sangre total fue el siguiente:

- 1 Se diluyen los 6 cc de sangre periférico total en un tubo Falcon con STMT hasta completar un volumen de 50 ml.
- 2 A continuación se resuspende bien y se deja 5 minutos en la nevera a 4°C.
- 3 Se centrifuga a 3.500 rpm durante 20 minutos y se elimina cuidadosamente el

sobrenadante.

- 4 Una vez retirado el sobrenadante se vuelve a resuspender en STMT hasta completar el volumen de 50 ml y se centrifuga nuevamente a 3.500 rpm durante 20 minutos.
- 5 Eliminamos el sobrenadante con cuidado y añadimos al sedimento 4'5 ml de la Solución B y 0'5 ml de la Solución C.
- 6 Agitamos bien en un vórtex, de forma que el sedimento quede resuspendido.
- 7 Dejamos la muestra toda la noche en un baño con agitación constante a 37°C.
- 8 Al día siguiente se sacan los tubos del baño y se añaden 1'7 ml de NACI 6M.
- 9 Se mezcla en vórtex durante 15 segundos.
- 10 Se centrifuga a 3.500 rpm durante 20 minutos.
- 11 Si todavía quedaran partículas en suspensión habría que volver a centrifugar.
- 12 A continuación se recoge con mucho cuidado el sobrenadante y se pasa a un tubo estéril.
- 13 Para precipitar el ADN se añade 1 volumen de isopropanol, mezclándose por inversión hasta la formación de una medusa compacta.
- 14 Se pesca el ADN genómico y se disuelve en 400 ul de TE estéril.
- 15 Se deja en un baño con agitación a 37°C durante 1 hora.
- 16 A continuación se deja enfriar en nevera a 4°C durante 2 días.
- 17 Por último, se hacen alícuotas en tubos eppendorf que se guardan en el congelador a - 40°C.

3.D. Extracción del ADN de suero:

3.D.1. Reactivos

- QIAamp Blood mini-kit (Quiagen).
- Proteasa liofilizada.

3.D.2. Extracción del ADN viral del suero

- Se mezcla 200 microlitros de suero con 25 ul de proteasa y 200ul de tampón de lisis.
- Se calienta 70°C durante 10 min.
- Luego se procesa utilizando QIAamp Blood mini-kit (Quiagen).
- El ADN que queda adherido a la QIAamp spin column se liberó con 50 ul de agua destilada.

3.E. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

3.E.1. Reactivos

- Buffer 10x (*Perkin-Elmer*).
- MgCl₂ 50 mM (*Biotoools*).
- dNTPs 320 mM (*Perkin-Elmer*).
- Iniciadores (*Progenetics*).
- Taq ADN polimerasa (*Biotoools*).
- Genoma purificado de CMV (*Sigma*).
- Genoma purificado de HVH-6 (*Amplichek*).
- Extracto de VEB de cultivo celular P3HR1 (proporcionado por el *Servicio de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III*).

3.E.2. Iniciadores

Para cada uno de los virus estudiados se realizó la PCR por separado, en presencia de iniciadores de β -globina, cuya amplificación se utilizó como control interno de reacción.

Las secuencias de los iniciadores y los tamaños de los fragmentos amplificados fueron:

Epstein-Barr (VEB) ³³									
AAG	GAG	GGT	GGT	TTG	GAA	AG			297
AGA	CAA	TGG	ACT	CCC	TTA	GC			
Citomegalovirus (CMV) ³⁴									
AGA	GTC	TGC	TCT	CCT	AGT	GT			289
CTA	TCT	CAG	ACA	CTG	GCT	CA			
Herpesvirus Humano tipo 6 (HVH-6) ³⁵									
CGG	TGT	CAC	ACA	GCA	TGA	ACT	CTC		834
GTG	GAT	CCG	ACG	TCC	TAC	AAA	CAC		
β -globina ³⁶									
GAA	GAG	CCA	AGG	ACA	GGT	AC			268
CAA	CTT	CAT	CCA	CGT	TCA	CC			
β -globina ³⁶									
GGT	TGG	CCA	ATC	TAC	TCC	CAG	G		536
GCT	CAC	TCA	GTG	TGG	CAA	AG			

3.E.3 Mezcla de reacción

Los reactivos y las concentraciones óptimas utilizadas se determinaron, previamente, con genoma purificado de cada uno de los virus estudiados y fueron las siguientes:

VIRUS DEL EPSTEIN-BARR (VEB)			
Fragmento amplificado	297 pb	β-globina empleada	268 pb
Reactivos	Concentración	Reactivos	Concentración
Tampón de reacción10x	1x	β-globina KM 29	1 μM
MgCl ₂	2'5 mM	β-globina RS 42	1 μM
dATP	400 μM	VEB-1	1 μM
dCTP	400 μM	VEB-2	1 μM
dGTP	400 μM	Muestra (ADN)	8 μl x tubo
dTTP	400 μM	Taq ADN polimerasa	1'25 U

CITOMEGALOVIRUS HUMANO (HCMV)			
Fragmento amplificado	289 pb	β-globina empleada	536 pb
Reactivos	Concentración	Reactivos	Concentración
Tampón de reacción10x	1x	β-globina KM 29	1 μM
MgCl ₂	2'0 mM	β-globina RS 42	1 μM
dATP	400 μM	CMV-1	1 μM
dCTP	400 μM	CMV-2	1 μM
dGTP	400 μM	Muestra (ADN)	8 μl x tubo
dTTP	400 μM	Taq ADN polimerasa	1'25 U

HERPESVIRUS HUMANO 6 (HVH 6)			
Fragmento amplificado		β-globina empleada	
	834 pb		268 pb
Reactivos	Concentración	Reactivos	Concentración
Tampón de reacción 10x	1x	β-globina GH 20	1 μM
MgCl ₂	2'5 mM	β-globina PC-04	1 μM
dATP	400 μM	HV6-1	1 μM
dCTP	400 μM	HV6-2	1 μM
dGTP	400 μM	Muestra (ADN)	8 μl x tubo
dTTP	400 μM	Taq ADN polimerasa	1'25 U

En todos los casos, el volumen final de reacción fue de 50 μl, por lo que se añadió agua destilada estéril para completar, en cada caso este volumen final.

Para reducir los riesgos de contaminación y de errores debidos al pipeteo de los reactivos se calculó, para cada uno de los virus, la mezcla necesaria para todos los tubos incluyendo todos los reactivos, exceptuando la muestra o el control. Se dispensaron 42 μl de mezcla por tubo añadiéndose a continuación 8 μl de muestra o de control. La preparación se cubrió con 150 μl de aceite mineral para evitar condensaciones que pudieran alterar las condiciones de la reacción.

3.E.4. Controles

Los controles utilizados fueron:

- Control negativo: la ausencia de contaminación se comprobó incluyendo un tubo conteniendo todos los componentes de la mezcla de reacción y 8 μl de agua bidestilada estéril en lugar de muestra.
- Control positivo interno: junto a los iniciadores destinados para amplificar cada uno de los genomas virales, se añadieron a la mezcla de reacción los iniciadores

PCO4, GH20 y KM29, RS42, según el tamaño amplificado en cada caso, que permiten amplificar un fragmento de 268 y 536 pb respectivamente del gen de la β -globina humana. Este control permitió verificar la ausencia de inhibidores de la reacción de amplificación así como la presencia de suficiente ADN.

- Control positivo externo: genoma purificado de CMV y HVH-6 y extracto de VEB de cultivo celular P3HR1.

3.E.5. Amplificación

Se llevó a cabo en un termociclador (*Perkin-Elmer/Cetus*). En todos los casos, en primer lugar se realizó una fase de desnaturalización consistente en un ciclo de 10 minutos de duración a 94°C. A continuación se realizaron 35 ciclos de amplificación:

Herpesvirus	Desnaturalización	Acoplamiento	Elongación
VEB	1' 30" a 94 °C	1' a 65 °C	1' 30" a 72 °C
CMV	2' a 94 °C	1' 30" a 65 °C	1' a 72 °C
HVH6	1' 30" a 94 °C	1' a 65 °C	1' 30" a 72 °C

Al término de los 35 ciclos se completó la reacción con una fase adicional de elongación a 72 °C durante 7'5 minutos.

3.E.6. Electroforesis

• Reactivos

- TAE. Tampón compuesto por Tris-ácido acético-EDTA (*Biorad*).
- Patrón de peso molecular (*DNA Molecular Weight Marker VIII, Roche Diagnostics*).
- Bromuro de etidio (0'1 5 μ g de bromuro de etidio, por mililitro) (*Biorad*).

Los productos amplificados se visualizaron en gel de agarosa al 3% (*Bio-Rad*) en TAE conteniendo 0'15 µg de bromuro de etidio por mililitro. Además de las muestras, en cada gel hicimos correr un patrón de peso molecular. Tras la electroforesis, los geles se visualizaron en un transiluminador de luz UV y se fotografiaron.

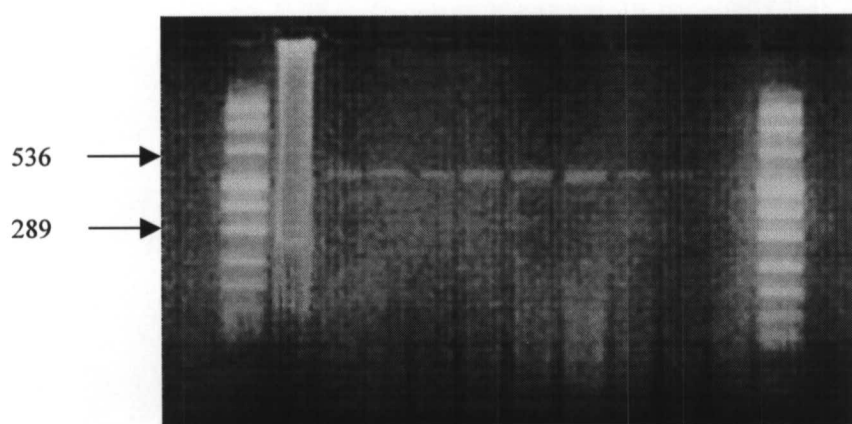


Figura 2

Fotografía de un gel de agarosa que representa una PCR convencional para la detección de CMV.

Pocillos 1 y 12: Marcador de peso molecular (*DNA Molecular Weight Marker, Roche diagnostics*)

Pocillo 2: Control positivo.

Pocillo 11: Control negativo.

Pocillos 3-10: Muestras de sangre total de enfermos negativas para CMV.

La banda de 536 pb corresponde al amplificado del gen de la β -globina.

La banda de 289 pb corresponde al amplificado de CMV.

3.E.7. Determinación de la sensibilidad de la técnica

Con el fin de determinar cuales eran los limites de resolución de las técnicas que íbamos a desarrollar (PCR), se realizó una serie de reacciones en las que la muestra problema utilizada fueron cantidades conocidas de genoma de cada uno de los virus incluidos en este estudio.

Utilizando el dato del número de copias que viene dado con los genomas purificados y destinados para ser utilizados como controles positivos, realizamos una serie de reacciones utilizando concentraciones decrecientes de cada uno de los genomas virales hasta determinar la sensibilidad de la técnica.

Finalmente, los resultados fueron repetidos tres veces, tanto para verificar los resultados obtenidos como para poner a punto la técnica que íbamos a utilizar con las muestras problema.

Partimos de 10.000 genomas por tubo de reacción y fuimos disminuyendo de 1.000 en 1000 hasta alcanzar los 5.000. A partir de aquí, fuimos bajando de 500 en 500 hasta llegar a 1.000 copias por tubo de reacción. De este punto, el descenso se hizo de 100 en 100 hasta las 100 copias, y de 10 en 10 hasta llegar a 0.

Los resultados fueron los siguientes: 1.000 copias en la primera reacción. 900 copias en la segunda reacción, pero sin una visualización clara de las bandas. 900 copias en la tercera reacción, con las bandas perfectamente visibles pero haciendo ligeras variaciones en las condiciones de reacción encaminadas a una mejor visualización de las bandas en la electroforesis.

Apenas hubo diferencias entre los distintos virus estudiados y todos tenían el mismo límite inferior de 900 copias.

3.F. PCR anidada, doble PCR o *nested* PCR

3.F.1. Iniciadores

Para cada uno de los virus estudiados se ha realizado la *nested* PCR por separado. Los iniciadores utilizados en la primera reacción fueron los utilizados para la PCR convencional, mientras que los iniciadores utilizados para la segunda reacción y los tamaños de los fragmentos amplificados fueron los siguientes:

Epstein-Barr (VEB) ³³									
ATC	GTG	GTC	AAG	GAG	GTT	CC			209
ACT	CAA	TGG	TGT	AAG	ACG	AC			
Citomegalovirus (CMV) ³⁴									
CCA	CCC	GTG	GTG	CCA	GCT	CC			162
CCC	GCT	CCT	CCT	GAG	CAC	CC			
Herpesvirus Humano 6 (HVH-6) ³⁵									
CTC	GGA	CTC	ATA	GAT	CTC	ATA	CTG		658
GGA	GAA	TCT	TGT	AAG	TAT	ATG	GTC		

Los iniciadores de cada virus fueron específicos al examinarlos para el ADN de los otros dos virus y del resto de los herpesvirus: virus herpes simple tipos 1 y 2, varicela-zoster, HVH-7 y HVH-8.

3.F.2. Mezcla de reacción

Los reactivos y las concentraciones óptimas utilizadas se determinaron previamente con genoma purificado de cada uno de los virus estudiados y fueron los siguientes:

VIRUS DEL EPSTEIN-BARR (VEB)			
Fragmento amplificado		β-globina empleada	
209 pb		268 pb	
Reactivos	Concentración	Reactivos	Concentración
Tampón de reacción10x	1x	MgCl ₂	2'5 mM
DATP	200 μM	VEB-3	1 μM
DCTP	200 μM	VEB-4	1 μM
DGTP	200 μM	Muestra (ADN)	5 μl x tubo
DTTP	200 μM	Taq ADN polimerasa	1 U
CITOMEGALOVIRUS HUMANO (HCMV)			
Fragmento amplificado		β-globina empleada	
162 pb		536 pb	
Reactivos	Concentración	Reactivos	Concentración
Tampón de reacción10x	1x	MgCl ₂	2 mM
DATP	200 μM	CMV-3	1 μM
DCTP	200 μM	CMV-4	1 μM
DGTP	200 μM	Muestra (ADN)	5 μl x tubo
DTTP	200 μM	Taq ADN polimerasa	1 U
HERPESVIRUS HUMANO 6 (HVH-6)			
Fragmento amplificado		β-globina empleada	
658 pb		268 pb	
Reactivos	Concentración	Reactivos	Concentración
Tampón de reacción10x	1x	MgCl ₂	2'5 mM
DATP	200 μM	HV6-3	1 μM
DCTP	200 μM	HV6-4	1 μM
DGTP	200 μM	Muestra (ADN)	5 μl x tubo
DTTP	200 μM	Taq ADN polimerasa	1 U

En todos los casos, el volumen final de reacción fue de 50 µl, por lo que se añadió agua destilada estéril para completar, en cada caso, este volumen final.

Al igual que se hizo para la PCR convencional, se calculó, para cada uno de los virus, la mezcla necesaria para todos los tubos incluyendo todos los reactivos, exceptuando la muestra o el control. La preparación se cubrió con 150 µl de aceite mineral para evitar condensaciones que pudieran alterar las condiciones de la reacción.

3.F.3. Controles

Los controles utilizados fueron:

- Control negativo: la ausencia de contaminación se comprobó incluyendo un tubo conteniendo todos los componentes de la mezcla de reacción y lo equivalente de agua bidestilada en lugar de la muestra.
- Control interno: junto a los iniciadores destinados para amplificar cada uno de los genomas virales, se añadieron a la mezcla de reacción los iniciadores PCO4, GH20 y KM29, RS42, según el tamaño del fragmento amplificado en cada caso, que permiten amplificar un fragmento de 268 y 536 pb respectivamente del gen de la β-globina humana. Este control permitió verificar la ausencia de inhibidores de la reacción de amplificación así como la presencia de suficiente ADN.

3.F.4. Amplificación

Se llevó a cabo en un termociclador (*Perkin-Elmer/Cetus*). En todos los casos, en primer lugar se realizó una fase de desnaturalización consistente en un ciclo de 10 minutos de duración a 94°C. A continuación se realizaron 35 ciclos de amplificación:

Herpesvirus	Desnaturalización	Acoplamiento	Elongación
VEB	1' 30" a 94 °C	1' a 65 °C	1' 30" a 72 °C
CMV	1' 30" a 94 °C	30" a 62 °C	1' 30" a 72 °C
HVH6	1' 30" a 94 °C	1' a 65 °C	1' 30" a 72 °C

Al término de los 35 ciclos se completó la reacción con una fase adicional de elongación a 72 °C durante 7'5 minutos.

3.F.5. Electroforesis

Los productos amplificados se visualizaron en gel de agarosa al 3% (*Amplisize*, *BioRad*) en TAE conteniendo 0'15 µg de bromuro de etidio por mililitro. Además de las muestras, en cada gel hicimos correr un patrón de peso molecular. Tras la electroforesis, los geles se visualizaron en un transiluminador de luz UV y se fotografiaron.

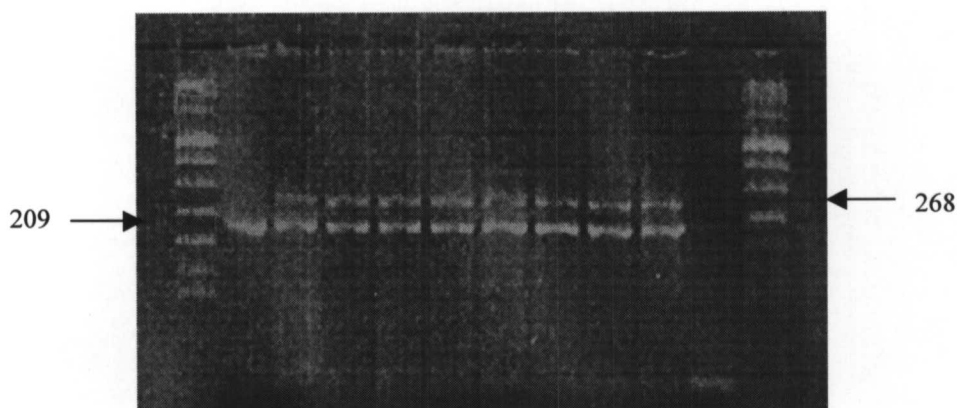


Figura 3.

Fotografía de un gel de agarosa que representa una PCR *nested* para la detección de VEB

Pocillos 1 y 12: Marcador de peso molecular (*DNA Molecular Weight Marker*, *Roche diagnostics*).

Pocillo 2: Control positivo.

Pocillo 11: Control negativo.

Pocillos 3-10: Muestras de sangre total de enfermos positivas para VEB.

La banda de 268 pb corresponde al amplificado del gen de la β -globina y la banda de 209 pb corresponde al amplificado de VEB.

3.F.6. Determinación de la sensibilidad de la técnica

Del mismo modo que se describió en el apartado 3.E.7, se realizó también para la *nested* PCR una determinación de la sensibilidad de la técnica, con el fin de determinar hasta cuántas copias era capaz de detectar.

Igualmente se realizó, previamente, una primera aproximación con la que pretendíamos conocer los rangos entre los que nos movíamos.

A continuación, partiendo de 1.000 genomas en el tubo de reacción fuimos disminuyendo de 100 en 100 hasta alcanzar los 500. A partir de aquí, fuimos bajando de 50 en 50 hasta llegar a 100 copias en el tubo de reacción. Desde este punto, el descenso se hizo de 10 en 10 hasta llegar a 10 copias. Se desechó la posibilidad de seguir el descenso en el número de copias de 1 en 1 desde este punto, porque se consideró que pequeños errores de pipeteo podrían conducir a resultados no válidos, debido a las pequeñas cantidades de muestra que nos veíamos obligados a manejar, y a las sucesivas diluciones que se tuvieron que realizar.

Esto mismo fue repetido tres veces en las que variamos ligeramente las condiciones de reacción, modificaciones encaminadas a una mejor visualización de las bandas en la electroforesis. Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

En los tres casos, se visualizó claramente la última banda de 10 copias y para los tres virus herpes estudiados el resultado fue el mismo.

3.G. Hibridación

3.G.1. Reactivos

- Kit de hibridación (*Sorin Biomédica Diagnostics*).
- TE. Tampón compuesto por 10 mM de Tris pH 7.5 y 1 mM de EDTA.

3.G.2. Técnica de ADN-enzimoinmunoensayo (DEIA)

La detección de los productos amplificados visualizados en la electroforesis en gel de agarosa se realizó utilizando la técnica ADN-enzimoinmunoensayo (DEIA). Se trata de una modificación del método clásico de enzimoinmunoensayo para adaptarlo a la detección de ADN. Esta técnica se basa en la hibridación del ADN amplificado con una sonda de ADN marcada con biotina y fijada a las paredes de los pocillos de una placa multipocillo mediante uniones estreptavidina-biotina³⁷.

Las sondas específicas utilizadas para la detección de los productos amplificados en la PCR y los tamaños de los fragmentos amplificados que se detectan se muestran a continuación:

Epstein-Barr (VEB)									
ATC	GTG	GTC	AAG	GAG	GTT	CC			209
ACT	CAA	TGG	TGT	AAG	ACG	AC			
Citomegalovirus (CMV)									
CCA	CCC	GTG	GTG	CCA	GCT	CC			162
CCC	GCT	CCT	CCT	GAG	CAC	CC			
Herpesvirus Humano tipo 6 (HVH-6)									
CTC	GGA	CTC	ATA	GAT	CTC	ATA	CTG		658
GGA	GAA	TCT	TGT	AAG	TAT	ATG	GTC		

La reacción se llevó a cabo utilizando placas de 96 pocillos (*Sorin Biomedica Diagnostics*) y cuyas paredes estaban recubiertas con estreptavidina. Los pasos que siguieron para cada pocillo fueron:

1. Fijación de la sonda biotinilada. Para ello se procedió a dispensar 100 µl de la sonda marcada y diluida (0'5 ng / µl) en tampón TE (pH 8'0).
2. Incubación a 4°C durante 18-20 horas.
3. Lavado de la placa con una solución de PBs y Tween 20 para eliminar posibles restos de sonda no fijados a la placa.
4. Desnaturalización de las muestras y controles (100°C, 15 minutos). Para evitar su renaturalización se mantuvieron en hielo hasta su utilización.
5. Adición de 100 µl de tampón de hibridación (conteniendo solución de Derhardt, SSC en tampón Tris HCl y EDTA) y 20 µl de control o muestra desnaturalizados.
6. Hibridación (55°C, 60 minutos).
7. Adición de anticuerpo monoclonal de ratón anti-ADN de doble cadena (*Sorin Biomedica Diagnóstics*).
8. Incubación durante 60 min. a temperatura ambiente.
9. Lavado (5 lavados sucesivos con una solución de PBS y Tween 20).
10. Adición de anticuerpo monoclonal de caballo anti-Igg de ratón y conjugado con peroxidasa (*Sorin Biomedica Diagnostics*).
11. Incubación de la placa durante una hora a temperatura ambiente.
12. Lavado (5 lavados sucesivos con el mismo tampón de lavado).
13. Adición de 100 µl de una solución conteniendo tetrametilbenzidina como cromógeno.
14. Incubación durante 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad.
15. Frenado de la reacción con 200 µl de ácido sulfúrico 1N.

Los resultados se obtuvieron mediante la lectura de la absorbancia en fotómetro: cada pocillo se leyó a 450 nm y 630 nm; el valor definitivo se obtuvo tras restar el valor de absorbancia a 630 nm al obtenido a 450 nm.

Los controles empleados fueron:

- Control negativo. Consistente en una mezcla de tampón Tris-HCl, MgCl₂ y BSA. Se dispusieron los controles negativos por placa.
- Control positivo. Se utilizó una solución (2'5 ng / µl) de la secuencia oligonucleotídica complementaria de la sonda específica MIE diluida en tampón TE (pH 8.0).

3.H. PCR cuantitativa

3.H.1. Funcionamiento del aparato Rotor-Gene 2000

Combina en un solo instrumento, un termociclador, un detector de fluorescencia, y un software de aplicación específico.

El termociclador registra en un tiempo real la amplificación del ADN. Para ello, la unidad tiene un rotor con capacidad para 32 tubos estándar de 0,2 ml, que durante el funcionamiento gira a una velocidad de aproximadamente 600 rpm, a medida que los tubos siguen los ciclos de temperatura indicados.

El aparato tiene dos módulos de detección, el canal (1) que detecta emisiones a 510 nm y el canal (2) que detecta emisiones a 550 nm, lo que permite correr múltiples muestras al mismo tiempo. Mientras los tubos se están centrifugando, al pasar por los módulos detectores, las muestras se iluminan por un dispositivo emisor de luz de alta potencia.

Esta información es remitida a un ordenador que calcula la media de fluorescencia de cada muestra después de varios ciclos. A continuación esta información aparece en una pantalla en un tiempo real en un diagrama que representa la fluorescencia y el número de ciclos.

3.H.2. Reactivos

- Buffer 10x (*Perkin-Elmer*).
- MgCl₂ 50 mM (*Biotoools*).
- dNTPs 320 mM (*Perkin-Elmer*).
- Iniciadores y sonda (*Progenetics*).
- Genoma purificado de CMV (*Sigma*).
- Amplitaq Gold Taq ADN polimerasa (*PE Applied Biosystems*).
- Sonda, FAM o JOE (*Biosearch Technologies, Inc.*).

3.H.3. Diseño de la sonda TaqMan

En el diseño de la sonda TaqMan se han tenido en cuenta las consideraciones siguientes:

- Que el fragmento de la sonda a amplificar tenga de 50-100 pb.
- Que el tamaño de la sonda sea de 15-20 pb.
- Que la sonda hibride lo más cerca posible del extremo 5' del fragmento amplificado, sin llegar a solaparse con el iniciador 5' → 3'.
- Para la elección de los fluorocromos adecuados se siguieron las indicaciones de la casa comercial:
 - JOE: para el extremo 5' de la sonda TaqMan que se unía al fragmento viral buscado, cuya emisión se detectaba en el canal 2.

- FAM: para el extremo 5' de la sonda TaqMan que se unía al amplificado de β -globina, el control interno, y cuya emisión fue detectada en el canal 1.
- TAMRA: Quencher o apagador, para el extremo 3' de ambas sondas TaqMan.

3.H.4. Iniciadores y sonda

La secuencia de los iniciadores y las sondas utilizados fueron los siguientes:

Citomegalovirus (CMV) ³⁸									
5'	GTC	AGC	GTT	CGT	GTT	TCC	CA		3'
5'	GGG	ACA	CAA	CAC	CGT	AAA	GC		3'
Sonda (CMV) ³⁸									
5' FAM	TGA	TCG	GCG	TTA	TCG	CGT	TCT	TGA	TC
3'	TAMRA								
β -globina humana ³⁸									
5'	GCT	GTC	ATC	TCT	TGT	GGG	CTG	T	3'
5'	AAA	CTC	ATG	GGA	GCT	GCT	GGT	T	3'
Sonda (β -globina) ³⁸									
5' JOE	CCT	GTC	ATG	CCC	ACA	CAA	ATC	TCT	CC
3'	TAMRA								

3.H.5. Mezcla de reacción

Los reactivos utilizados y las concentraciones de los mismos fueron los siguientes:

CITOMEGALOVIRUS HUMANO (HCMV)			
Reactivos	Concentración	Reactivos	Concentración
Tampón de reacción	1x	CMV-1	0'5 μ M
MgCl ₂	1'5 mM	CMV-2	0'5 μ M
DATP	400 μ M	Sonda TaqMan CMV	0'25 μ M
DCTP	400 μ M	Muestra (ADN)	200 ng x tubo
DGTP	400 μ M	Taq ADN polimerasa	1 U
DTTP	400 μ M	dH ₂ O	-

En todos los casos, el volumen final de reacción fue de 25 μ l, por lo que se añadió agua destilada estéril para completar, en cada caso, este volumen final.

3.H.6. Metodología de PCR cuantitativa en tiempo real

La obtención de los resultados y el análisis de los mismos fue realizado por el software del Termociclador a tiempo real, Rotor Gene 2000.

La PCR en tiempo real utiliza la actividad exonucleasa 5'→3' de la Taq ADN polimerasa para partir la sonda interna marcada con dos fluorocromos, el emisor de fluorescencia y el apagador. La secuencia de los iniciadores y la sonda TaqMan utilizados para la amplificación de CMV se localizan en la región UL83 del genoma de CMV que codifica las proteínas de la matriz inferior. Estos iniciadores y sonda han sido específicos al examinarlos para el ADN de virus herpes simple tipos 1 y 2, Epstein-Barr, varicela-zoster, HVH-6, HVH-7 y HVH-8. Como control de la amplificación se ha utilizado un par de iniciadores y una sonda localizados en el gen de la β -globina humana.

Las condiciones para la PCR cuantitativa en tiempo real fueron como se ha descrito en el apartado 3.H.5, y cada muestra se analizó en cuadruplicado en dos PCRs consecutivas para la detección de CMV. La mezcla de reacción para β -globina fue idéntica a la de CMV excepto que se ha utilizado 0,25 μ M de iniciadores de β -globina en vez de CMV y 0,125 μ M de sonda TaqMan específica de β -globina y cada muestra se analizó solo una vez.

Se colocaron las muestras en el ciclador a tiempo real (Rotor-Gene 2000. *Corbett Research*) y se preincubaron a 95°C durante 15 minutos para activar la AmpliTaq Gold DNA polimerasa (PE Applied Biosystems). Luego se realizó PCR doble de 45 ciclos cada una: desnaturalización a 95°C durante 15" y acoplamiento-extensión durante 50" a 60 °C. Los ciclos para β -globina fueron idénticos a aquellos para CMV.

Con estos iniciadores y las condiciones de amplificación, la sensibilidad de la técnica de PCR en tiempo real fue de solo una copia tanto para CMV como para β -globina.

Cuando la sonda está íntegra, el emisor y el apagador experimentan una transferencia de energía de resonancia fluorescente, suprimiendo así la fluorescencia del emisor. Cuando el ADN diana está presente, después de la elongación de los iniciadores, la sonda se parte por la actividad exonucleasa 5'→3' de la Taq polimerasa. El emisor ya no está físicamente junto al apagador sobre la sonda, y la transferencia de energía de resonancia fluorescente se interrumpe. Esto da lugar a un aumento de la fluorescencia del emisor que es proporcional a la cantidad de producto acumulado por la PCR³⁹.

El número de copias de ADN se determinó interpolando los resultados de las muestras problema en una curva estándar de cantidades conocidas. Para el diseño de la curva estándar se ha utilizado genoma de CMV purificado y cuantificado (ABI). En primer lugar, se ha intentado determinar el rango de copias de CMV en pacientes trasplantados, y luego se ha decidido que los puntos de la curva estándar serían 10 copias, 100 copias, 1000 copias, 10.000 copias. Cada punto se había triplicado y se repitió la curva estándar para cada PCR.

Mientras los tubos están centrifugando, al pasar por los módulos detectores, las muestras se iluminan por un dispositivo emisor de luz de alta potencia y un fotomultiplicador recibe la energía fluorescente que va aumentando durante la amplificación. Esta información es remitida a un ordenador que calcula la media de energía de cada muestra después de varios ciclos. A continuación esta información aparece en una pantalla en un tiempo real en un diagrama que representa la fluorescencia y el número de ciclos.

Para el análisis de los resultados cuantitativos (figura 4), el software traza el log de la señal normalizada con relación a una referencia interna (ΔR_n) y fija el *ciclo umbral* (C_T) que es el número de ciclos de la PCR que se requiere para que la intensidad de fluorescencia exceda un umbral arbitrario en la fase exponencial de la amplificación, cuando ΔR_n equivale a 10 desviaciones estándar de la línea basal. De esta forma, se ha obtenido un valor de C_T para cada muestra. A continuación, se ha obtenido una curva estándar trazando el C_T contra la cantidad del ADN total de la reacción, que se ha utilizado para comparar la cantidad que puede haber de ADN-CMV en las muestras de los enfermos (figuras 5 y 6). El cálculo de C_T , ΔR_n , la preparación de la curva estándar y la cuantificación de ADN en las muestras se realizó por el software aportado con el termociclador a tiempo real Rotor-Gene 2000.

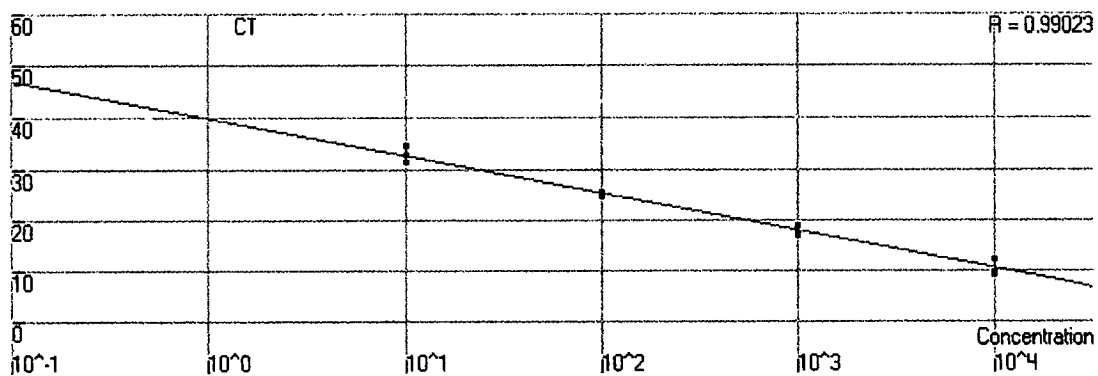


Figura.4. Recta patrón

Recta patrón obtenida por la PCR cuantitativa a tiempo real. En ella se representan los valores de C_T frente al número inicial de copias de ADN de CMV. La recta patrón mostró una estrecha relación entre el número de copias y los valores de C_T ($R=0.990$).

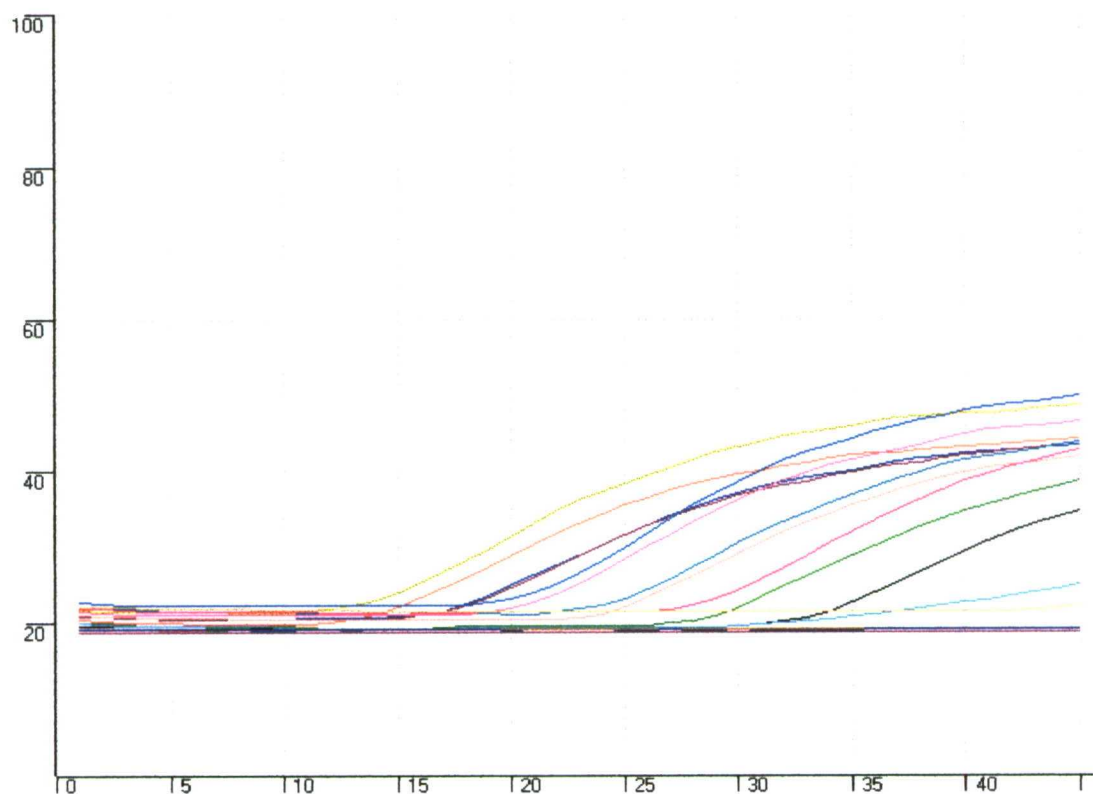


Figura.5: Representación de la amplificación de las muestras por PCR cuantitativa a tiempo real.

Cada una de las muestras estudiadas, tanto problemas como las que forman parte de la recta patrón, se muestran en un color. A medida que transcurren los ciclos de amplificación, las señales emitidas por las muestras positivas comienzan a aumentar de forma exponencial, alcanzándose al final un *plateau* o meseta cuando comienzan a agotarse los reactivos presentes en la mezcla.

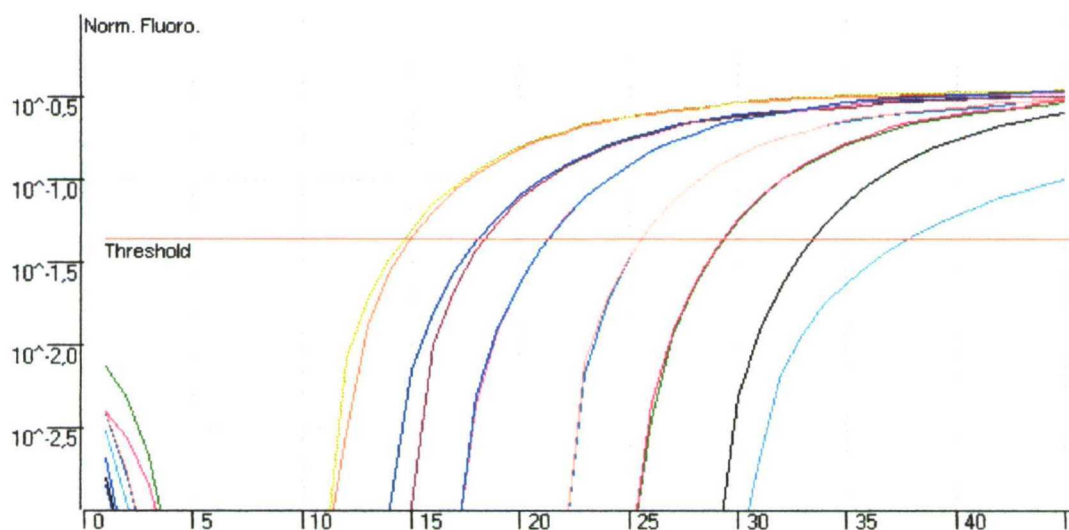


Figura. 6: Representación logarítmica. *Threshold* o punto de corte.

El ADN total de los puntos que conformaban la recta patrón y que oscilaban de 10 a 10.000 copias de ADN de CMV, así como el de las muestras problemas, fue analizado mediante una representación logarítmica de la señal normalizada frente al número de ciclos. Las desviaciones mínimas entre las muestras duplicadas indica la alta reproducibilidad de este estudio (la diferencia entre los valores de C_T en las muestras duplicadas osciló entre 0 y 0.36).

3.I. Definiciones

Teniendo en cuenta las definiciones de infección activa y enfermedad por CMV dadas por otros autores⁴⁰⁻⁴³, en este estudio la infección activa se ha definido como la positividad de cualquier método de diagnóstico de los siguientes: PCR *nested* en suero, detección del antígeno pp65, viremia por cultivo de *shell-vial* y detección de IgM específico. La infección sintomática por CMV se ha definido como la detección de ADN-CMV por PCR *nested* en suero más Antigenemia positiva o viremia por cultivo más fiebre no explicada, leucopenia ($< 4 \times 10^9 / L$) trombocitopenia ($< 150 \times 10^9 / L$), aumento no explicado del nivel de creatinina en suero, tests de función hepática anormales, fatiga debilitante no explicada o CMV con invasión tisular.

3.J. Análisis estadístico

Las variables estadísticas se han presentado con su distribución de frecuencias. La asociación entre variables cualitativas independientes se estudió mediante el *Test de la χ^2 (ji-cuadrado)* o el *Test exacto de Fisher*. La comparación entre variables cualitativas pareadas se hizo mediante el *Test de Mac Nemar*.

Las variables cuantitativas se resumen en su media y desviación estándar (D.E). La relación de estas variables se estudió mediante el *Test de la t de Student* en el caso de comparaciones con variables con dos categorías. Se realizó el estudio previo de la normalidad y la homogeneidad de varianzas. La prueba no paramétrica de *Mann Whitney* se utilizó cuando las variables cuantitativas no se distribuían normalmente.

La validez de criterio de las pruebas estudiadas se concretó mediante la sensibilidad, especificidad, y concordancia global u observada. La interpretación de las mismas se realizó mediante el valor global, los valores predictivos y la razón de verosimilitud positiva y negativa. Se estimó el índice kappa de concordancia entre

pruebas. La asociación se cuantificó mediante la odds ratio (O.R.) junto con su intervalo de confianza al 95%.

Se determinó en la carga viral el punto que mejor discrimina la presencia del virus con una curva de rendimiento diagnóstico (COR). Se presentan las áreas bajo la curva y su intervalo de confianza al 95%.

En todos los tests estadísticos se rechazó la hipótesis nula cuando α (error tipo I) fue menor de 0,05.

Los paquetes estadísticos utilizados fueron SPSS versión 10 y Epidat versión 2.0.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

En este estudio, se ha realizado la reacción en cadena de la polimerasa anidada (PCR *nested*) para cada uno de los tres virus incluidos en 536 muestras de sangre e igual número de muestras de suero, extraídas de forma secuencial de un total de 67 enfermos durante los 6 meses siguientes al trasplante renal. Con el objeto de realizar un estudio comparativo de resultados, hemos utilizado la sangre de 67 personas supuestamente sanas, donantes de sangre, con iguales características de edad y sexo como grupo control.

4.A. Resultados de la Reacción en cadena de la polimerasa anidada o doble (*nested PCR*)

4.A.1. Prevalencia global de la infección por CMV, VEB y HHV6 en el grupo de enfermos y en el grupo control. Distribución por sexo

La prevalencia global se ha obtenido tanto en muestras de sangre como de suero, considerando en cada caso, 1- las prevalencias detectadas de ADN viral por PCR *nested* en pacientes y en el grupo control, cuando al menos una muestra fue positiva, 2- las frecuencias de detección de ADN de los virus estudiados en el total de muestras.

I- Muestras de sangre total

En la tabla 3, se muestra el número y porcentaje de enfermos y donantes en los que la PCR *nested* fue positiva en al menos una muestra de sangre periférica estudiadas y la distribución de los mismos por sexo.

Tabla 3. Detección de ADN de CMV, VEB y HVH-6 por PCR *nested* en muestras de sangre. Distribución de las prevalencias por sexo.

Virus	SANGRE TOTAL											
	ENFERMOS						DONANTES					
	TOTAL		HOMBRES		MUJERES		TOTAL		HOMBRES		MUJERES	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
CMV	65	97,0	39	97,5	26	96,2	38	56,7	25	62,5	13	48,1
VEB	62	92,5	38	95,0	24	88,9	22	32,8	12	30,0	10	37,0
HVH-6	56	83,5	32	80,0	24	88,9	14	20,9	10	25,0	4	14,8

En el grupo de enfermos se ha detectado, en al menos una muestra, ADN de CMV, VEB y HVH-6 en 65, 62 y 56 pacientes cuyos porcentajes corresponden al 97%, 92,5% y 83,5% respectivamente. En los hombres, la prevalencia de infección fue de 39 (97,5%) para CMV, 38 (95%) para VEB y 32 (80%) para HVH-6. En las mujeres, estas prevalencias fueron de 26 (96,2%) para CMV y 24 (88,9%) para VEB y para HVH-6. Esta frecuencia de infección por los tres virus, no se ve influenciada por el sexo; $p = 0,1$ para CMV, $p = 0,3$ para VEB y $p = 0,5$ para HVH-6.

En el grupo control, se ha detectado ADN de CMV, VEB y HVH-6 en 38, 22 y 14 donantes correspondientes al 56,7%, 32,8% y 20,9% respectivamente. En los hombres, estas prevalencias fueron en el caso de CMV: 25 (62,5%), VEB: 12 (30%) y HVH-6: 10 (25%). En las mujeres, las prevalencias fueron de 13 (48,1%) para CMV, 10 (37%) para VEB y 4 (14,8%) para HVH-6. Al igual que el grupo de enfermos, en donantes no hay diferencia estadísticamente significativa entre mujeres y hombres respecto a la frecuencia de infección por los tres virus: $p = 0,5$ para CMV, $p = 0,6$ para VEB y $p = 0,5$ para HVH-6.

La diferencia entre los enfermos y donantes fue estadísticamente significativa, $p < 0,001$ para CMV, para VEB y para HVH-6.

Considerando el total de muestras de sangre, en la tabla 4 se recogen las prevalencias de ADN de los 3 virus herpes estudiados.

Tabla 4. Frecuencias de detección de ADN en el total de muestras de sangre, de enfermos y donantes.

Virus	MUESTRAS DE SANGRE TOTAL			
	ENFERMOS		DONANTES	
	TOTAL		TOTAL	
	Nº	%	Nº	%
CMV	352	65,7	38	56,7
VEB	197	36,8	22	32,8
HVH-6	134	25	14	20,9

En el grupo de enfermos, de un total de 536 muestras de sangre, se ha detectado ADN de CMV, VEB y de HVH-6 en 352, 197 y 134 muestras que corresponden al 65,7%, 36,8% y 25% respectivamente. En el grupo control, las frecuencias fueron 38 muestras positivas para CMV, 22 para VEB y 14 para HVH-6 que corresponden al 56,7%, 32,8% y 20,9% respectivamente. Entre el grupo de enfermos y el grupo control no se encontró una diferencia estadísticamente significativa en las prevalencias de ADN de los tres virus herpes estudiados en las muestras de sangre, $p = 0,2$ para CMV, $p = 0,6$ para VEB y $p = 0,6$ para HVH-6.

II- Muestras de suero

En la tabla 5, se muestra el número y porcentaje de enfermos y donantes en los que al menos se ha detectado una muestra positiva para ADN de CMV, VEB o HVH-6 en suero y la distribución de los mismos por sexo.

Tabla 5. Detección de ADN de CMV, VEB y HVH-6 por PCR *nested* en suero y la distribución de prevalencias por sexo.

Virus	SUERO											
	ENFERMOS						DONANTES					
	TOTAL		HOMBRES		MUJERES		TOTAL		HOMBRES		MUJERES	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
CMV	50	74,6	29	72,5	21	77,8	3	4,5	1	2,5	2	7,4
VEB	43	64,2	25	62,5	18	66,7	2	3,0	1	2,5	1	2,5
HV-6	39	58,2	21	52,5	18	66,7	0	0,0	0	0,0	0	0,0

Considerando las muestras de suero, en el grupo de enfermos, se ha detectado en al menos una muestra, ADN de CMV, VEB y HVH-6 en 50, 43 y 39 pacientes cuyos porcentajes corresponden al 74,6%, 64,2% y 58,2% respectivamente. En los hombres, la prevalencia de infección fue de 29 (72,5%) para CMV, 25 (62,5%) para VEB y 21 (52,5%). En las mujeres, estas prevalencias fueron de 21 (77,82%) para CMV, 18 (66,7%) para VEB y 18 (66,7) para HVH-6. Esta frecuencia de infección por los tres virus no se ve influenciada por el sexo; $p = 0,7$ para CMV, $0,7$ para VEB y $0,3$ para HVH-6.

En el grupo control, se ha detectado ADN de CMV y VEB en 3 y 2 donantes que corresponden al 4,5% y 3% respectivamente. En los hombres, estas prevalencias fueron para CMV: 1 (2,5%) y VEB: 1 (2,5%). En las mujeres, las prevalencias fueron de 2 (7,4%) para CMV y 1 (2,5%) para VEB. No se ha detectado el ADN de HVH-6 en el grupo de sujetos sanos. Al igual que el grupo de enfermos, en donantes no hay diferencia entre mujeres y hombres respecto a la frecuencia de infección por los tres virus; $p = 0,6$ para CMV, $p = 1$ para VEB y $p = 1$ para HVH-6. La diferencia entre los enfermos y donantes fue estadísticamente significativa, $p < 0,001$ para CMV, VEB y HVH-6.

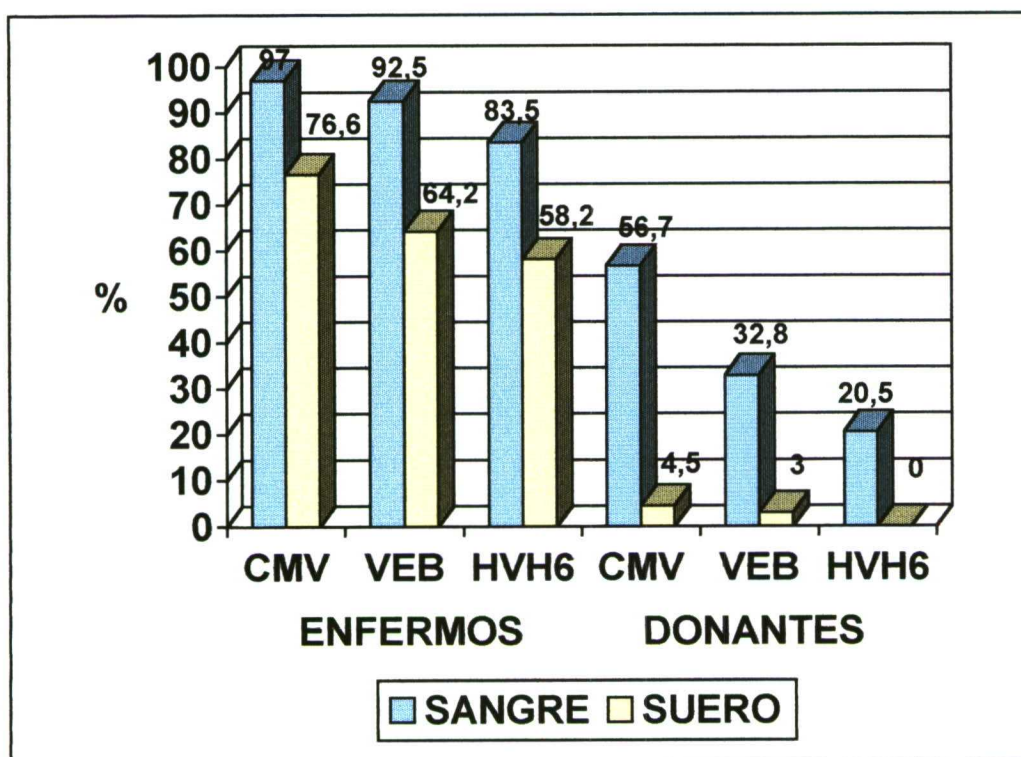


Figura 7.

Distribución de prevalencias de los enfermos y donantes en los que la PCR *nested* fue positiva en al menos una muestra en sangre y suero.

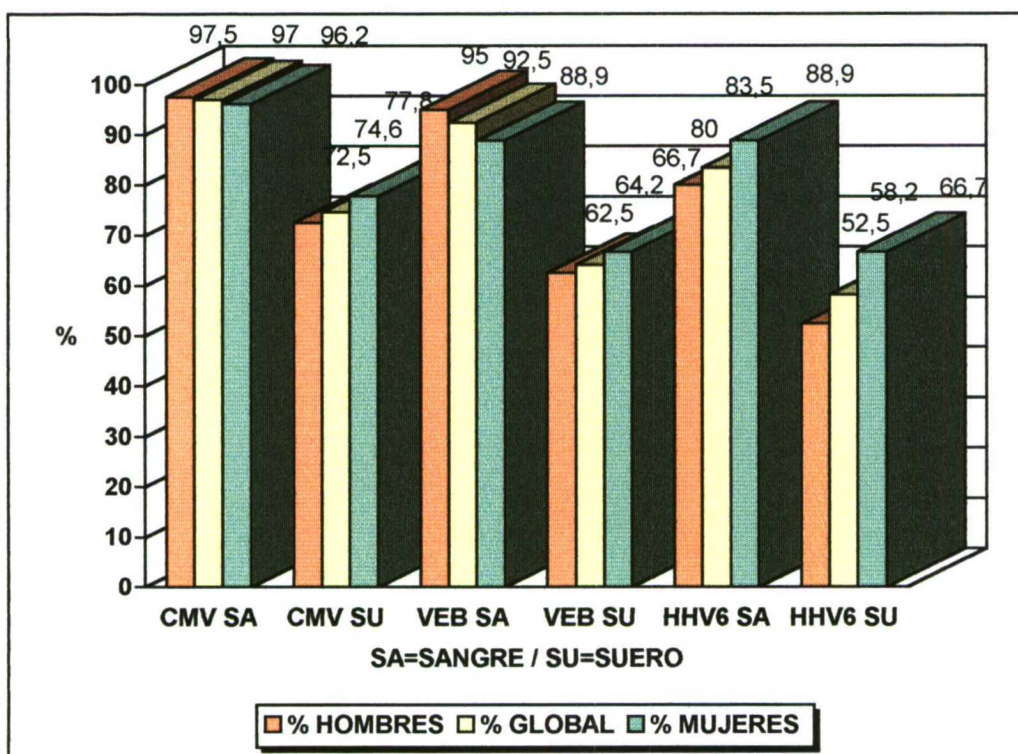


Figura 8.

Comparación de las prevalencias de infección en hombres y mujeres respecto a la media global en el grupo de enfermos.

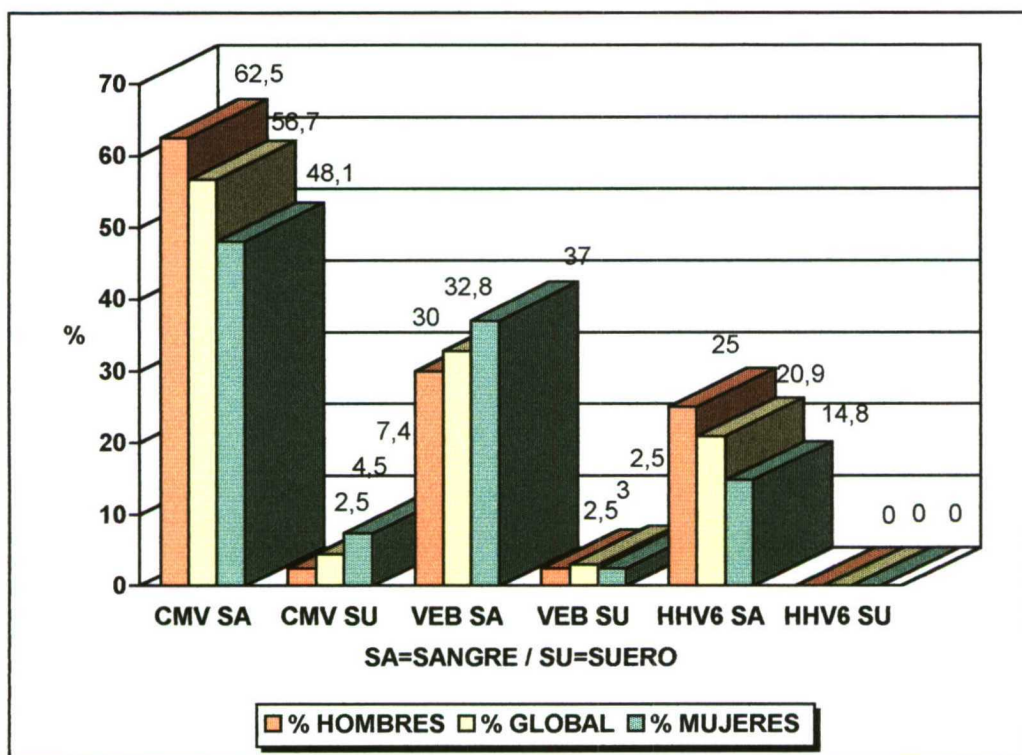


Figura 9.

Comparación de las prevalencias de infección en hombres y mujeres respecto a la media global en el grupo control.

Al considerar el total de muestras de suero, en la tabla 6, se recogen las prevalencias de ADN de los 3 virus herpes estudiados en suero.

Tabla 6. Prevalencias de ADN de los virus estudiados en el total de muestras de suero en el grupo de enfermos y en el control.

Virus	MUESTRAS DE SUERO			
	ENFERMOS		DONANTES	
	TOTAL		TOTAL	
	Nº	%	Nº	%
CMV	120	22,4	3	4,5
VEB	72	13,4	2	3
HHV6	57	10,6	0	0

En el grupo de enfermos, de un total de 536 muestras de suero se ha detectado ADN de CMV, VEB y de HVH-6 en 120, 72 y 57 muestras que corresponden al 22,4%, 13,4% y 10,6% respectivamente. En el grupo control, las frecuencias fueron 3 muestras positivas para CMV, 2 para VEB y ninguna para HVH-6 que corresponden al 4,5% y 3% respectivamente. Mediante el test de chi cuadrado, se pone de manifiesto que entre ambos grupos hay una diferencia estadísticamente significativa en la frecuencia de detección de ADN en las muestras de suero, $p < 0,001$ para CMV, VEB y HVH-6.

Tanto en el grupo de enfermos como en el grupo control, se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las prevalencias de los tres virus herpes estudiados en sangre y suero, $p < 0,001$.

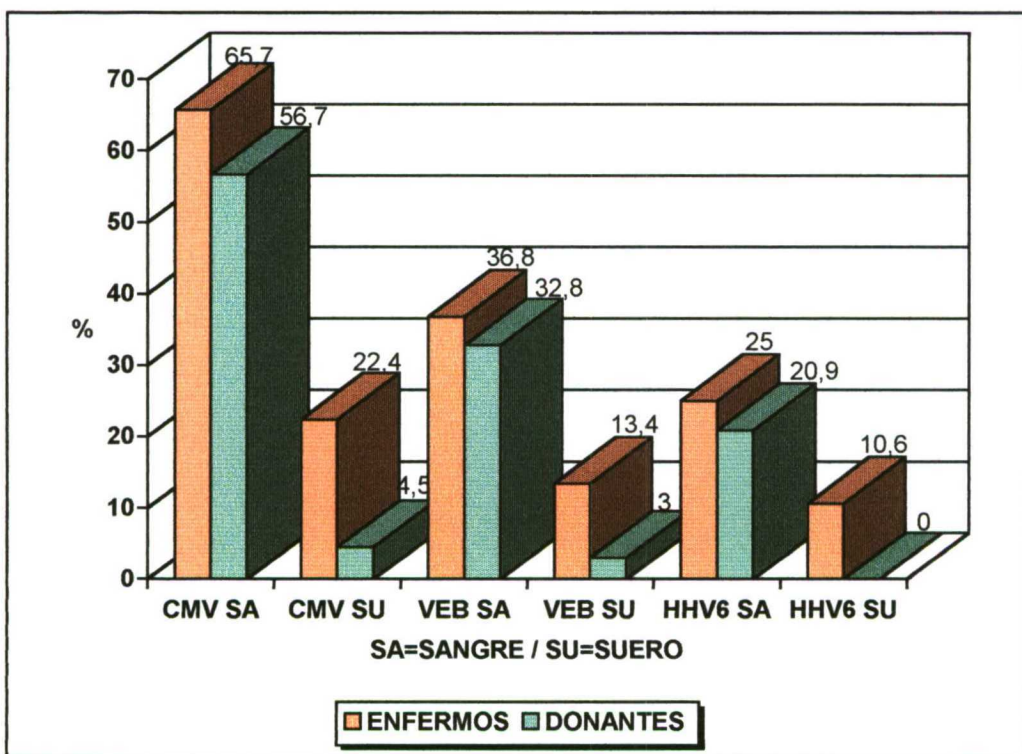


Figura 10.

Prevalencias de ADN de CMV, VEB y HVH-6 en el total de muestras, de sangre y de suero del grupo de enfermos y del grupo control.

4.A.2. Influencia de la edad en la prevalencia de infección por CMV, VEB y HVH-6

Tabla 7. Distribución por grupos de edad de las frecuencias de detección de ADN de los virus herpes estudiados.

Edad Años	N°	ENFERMOS						DONANTES					
		SANGRE			SUERO			SANGRE			SUERO		
		CMV	VEB	H-6	CMV	VEB	H-6	CMV	VEB	H-6	CMV	VEB	H-6
< 50	34	49,7	48,2	44,8	47,5	48,6	42,1	60,5	45,5	50,0	33,3	50,0	0,0
> 50	33	50,3	51,8	55,2	52,5	51,4	57,9	39,5	54,5	50,0	66,7	50,0	0,0

En el grupo de enfermos, hubo 34 pacientes en el grupo de edad de menos de 50 años en los que se ha detectado en sangre ADN de CMV, de VEB y de HVH-6 en el 49,7%, 48,2% y 44,8% respectivamente. En el suero de estos pacientes, se ha detectado ADN de CMV, de VEB y de HVH-6 en el 47,5%, 48,6% y 42,1% respectivamente. En el grupo de edad de más de 50 años, hubo 33 pacientes en los que la prevalencia de ADN en sangre fue del 50,3 % para CMV, 51,8% para VEB y 55,2% para HVH-6. En este grupo, las frecuencias de detección de ADN en suero fueron del 52,5% para CMV, 51,4% para VEB y 57,9% para HVH-6.

En el grupo de enfermos, no se encontró una diferencia estadísticamente significativa en la distribución de prevalencias de los tres virus para los dos grupos de edad establecidos, entre sangre y suero, $p = 0,67$ para CMV, $p=0,98$ para VEB y $p = 0,73$ para HVH-6.

En el grupo control, en el grupo de edad de menos de 50 años se ha detectado en sangre ADN de CMV, VEB y de HVH-6 en el 60,5%, 45,5% y 50% respectivamente. En el suero de estos pacientes, las frecuencias de detección de ADN fueron del 33,3% para CMV, 50% para VEB. No se encontró en ningún caso ADN de HVH-6. En el grupo de edad de más de 50 años, la prevalencia de ADN en sangre fue del 39,5% para CMV, 54,5% para VEB y 50% para HVH-6. En este grupo, las frecuencias de detección de ADN en suero fueron del 66,7% para CMV, 50% para VEB y no se ha detectado ADN de HVH-6.

En el grupo control, se ha encontrado para los dos grupos de edad la misma frecuencia en la distribución de prevalencias de ADN de los tres virus entre sangre y suero, $p = 0,56$ para CMV, $p = 1$ para VEB y HVH-6.

No se hallaron diferencias para los dos grupos de edad en la distribución de prevalencias de ADN en sangre para los tres virus, entre el grupo de enfermos y el grupo control, $p = 0,21$ para CMV, $p = 0,79$ para VEB y $p = 0,53$ para HVH-6. Tampoco se encontró una diferencia entre ambos grupos en suero, $p = 0,62$ para CMV, $p = 0,97$ para VEB y $p = 1$ para HVH-6.

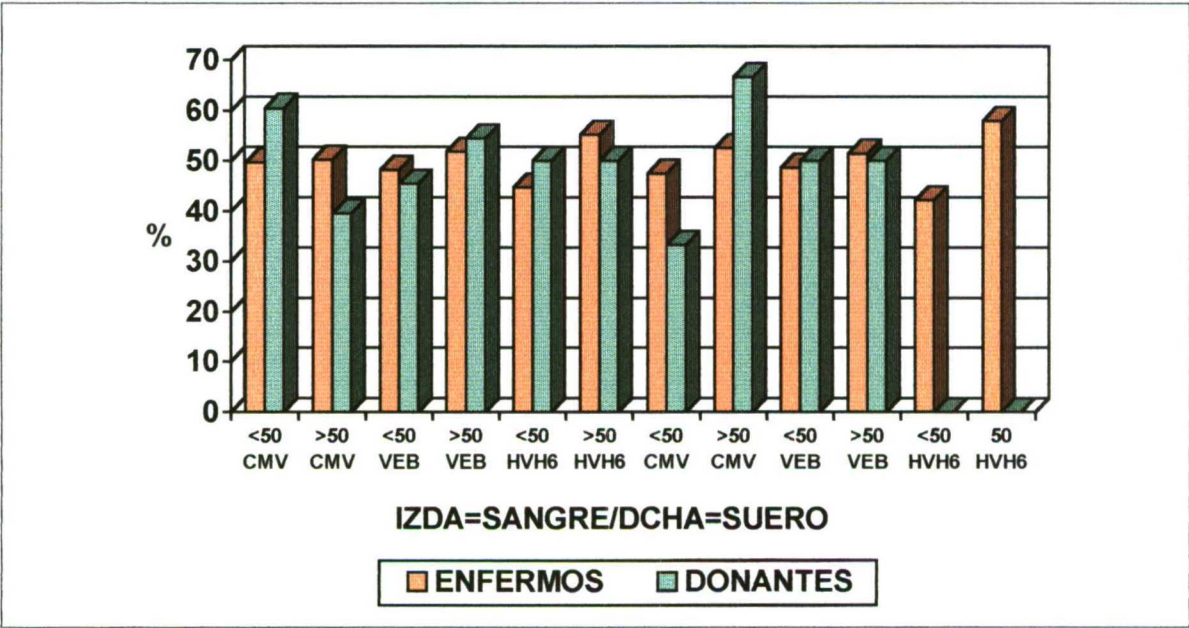


Figura 11.
Distribución por grupos de edad de las prevalencias de ADN de CMV, VEB y HVH-6 en
sangre y suero de enfermos y donantes.

4.A.3. Estudio de las prevalencias de coinfección

En la tabla 8, se reflejan los porcentajes de las muestras en las que se ha detectado tanto ADN de un solo virus como cuando se ha encontrado una coinfección por dos o por los tres virus estudiados.

Tabla 8. Distribución de las frecuencias de coinfección en el grupo de enfermos como en el grupo control, del total de muestras positivas de sangre y suero.

%	ENFERMOS						DONANTES					
	SANGRE			SUERO			SANGRE			SUERO		
	CMV	VEB	H-6	CMV	VEB	H-6	CMV	VEB	H-6	CMV	VEB	H-6
Un virus	42,9	19,3	9,0	61,7	56,9	42,1	50,0	45,0	35,3	100	100	0,0
Dos virus	41,8	53,3	50,7	33,3	34,7	47,4	43,7	45,0	52,9	0,0	0,0	0,0
Tres virus	15,3	27,4	40,3	5,0	8,3	10,5	6,3	10,0	11,8	0,0	0,0	0,0
Total	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	0,0

I- Resultados de infección por un virus

En el grupo de enfermos, del total de muestras positivas de sangre, la frecuencia de infección para CMV fue del 42,9%, 19,3% para VEB y 9% para HVH-6. En suero la frecuencia de infección fue del 61,7%, 56,9% y 42,1% para CMV, VEB y HVH-6 respectivamente. Se ha encontrado una diferencia estadísticamente significativa entre las prevalencias en sangre y las obtenidas en suero, $p = 0,001$ para CMV, $p < 0,001$ para VEB y HVH6.

En el grupo control, del total de muestras positivas de sangre, la frecuencia de infección fue del 50% para CMV, del 45% para VEB y del 35,3% para HVH-6. En suero la prevalencia de infección por un virus fue del 100% para CMV y VEB. No se ha detectado la presencia de HVH-6 en ninguna de las muestras estudiadas. En el grupo control, No se ha ndetectado diferencias estadísticamente significativas entre las prevalencias de sangre y de suero, $p = 0,49$ para CMV, 0,6 para VEB y 1 para HVH-6.

II- Muestras de sangre y de suero, en las que se ha detectado el ADN de más de un virus.

En los pacientes, la frecuencia de coinfección por dos virus en sangre fue del 41,8% para CMV con un virus más; del 53,3% para VEB con un virus más y del 50,7% para HVH-6. Las frecuencias de coinfección en suero fueron de 33,3% para CMV, 34,7% para VEB y 47,4% para HVH-6. Se observa que la frecuencia de coinfección por dos virus fue más alta para cada uno de los tres virus en sangre.

En sangre, se ha detectado ADN de los tres virus herpes en 54 muestras y fue del 15,3% para CMV, 27,4% para VEB y 40,3% para HVH-6. La frecuencia de infección para los tres virus fue más alta en sangre que en suero, 6 muestras positivas, y las frecuencias fueron del 5%, 8,3% y 10,5% para CMV, VEB y HVH-6 respectivamente.

En los donantes de sangre, la frecuencia de coinfección por dos virus en sangre fue del 43,7% para CMV con un virus más, 45% para la infección por VEB con un virus más y 52,9% para la infección por HVH-6 con un virus más. Las frecuencias de coinfección en suero de donantes fueron nulas para cada uno de los virus. La frecuencia de infección por los tres virus en sangre fue del 6,3% para CMV, 10% para VEB y 11,8 para HVH-6. Las frecuencias de infección por tres virus en suero fueron nulas para CMV, VEB y HVH-6.

Es decir, según el análisis estadístico de *ji cuadrado* en el grupo de enfermos y para todas las modalidades de coinfección se encontró una diferencia de prevalencias cuando se comparan los resultados en sangre con los obtenidos en suero, $p = 0,001$ (1 vs 2, $p = 0,01$ y 1 vs 3, $p = 0,001$) para CMV, para VEB y HVH-6 $p < 0,001$ (1 vs 2, $p < 0,001$ y 1 vs 3, $p < 0,001$). En el grupo control, no se detectaron diferencias entre los resultados de sangre y de suero, $p = 0,49$ para CMV, 0,6 para VEB y 1 para HVH-6. Al comparar los resultados en sangre de enfermos y donantes, no hubo diferencia entre prevalencias para CMV, $p > 0,7$ (1 vs 2, $p < 0,001$ y 1 vs 3 $< 0,01$) y para VEB, $p > 0,6$. Sin embargo, hubo una diferencia estadísticamente significativa entre las prevalencias en sangre y en suero para HVH-6, $p < 0,001$. Al comparar las prevalencias en suero entre ambos grupos, no se encontró diferencia para los tres virus herpes, $p = 0,57$ para CMV, 0,72 para VEB, y $p = 1$ para HVH-6.

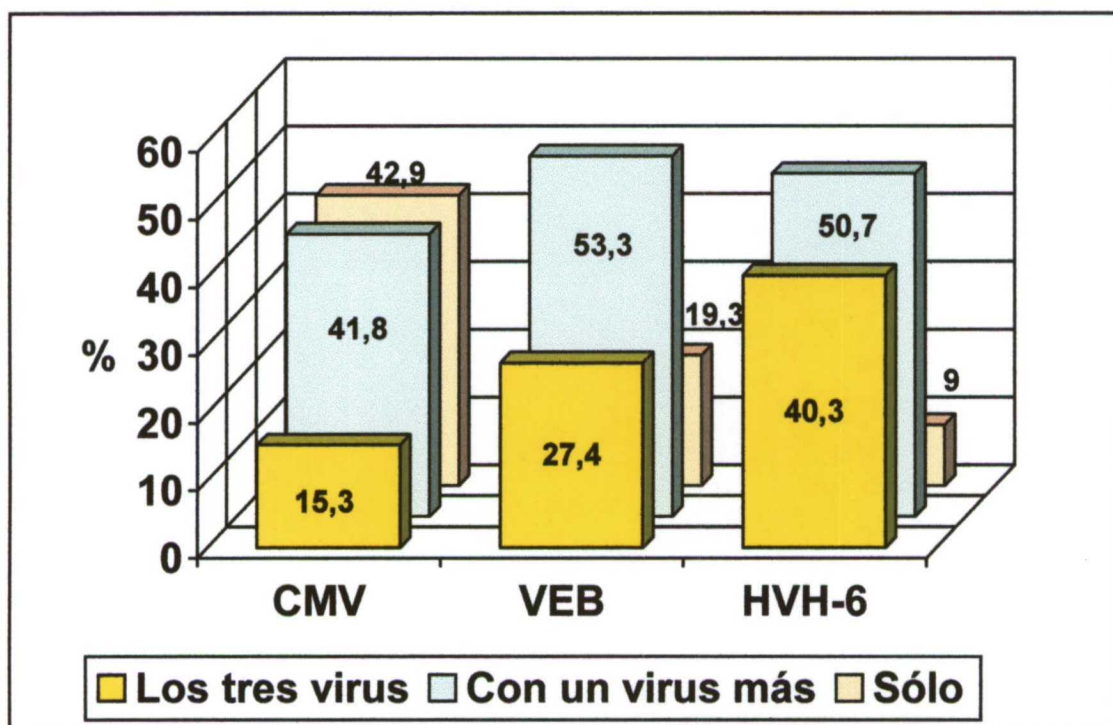


Figura 12.

Distribución de las prevalencias de coinfección en sangre del grupo de enfermos.

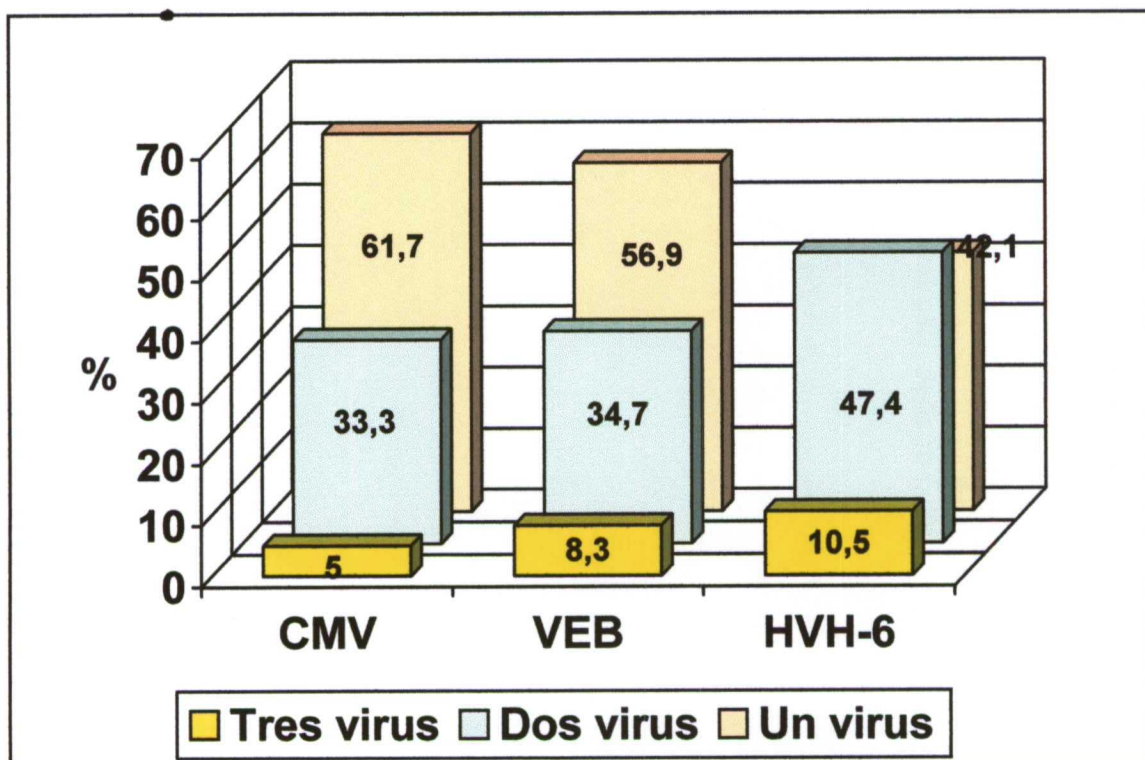


Figura 13.

Distribución de las prevalencias de coinfección en suero del grupo de enfermos.

III- Análisis de las prevalencias de coinfección por dos virus en sangre y suero.

En las figuras 14, 15 y 16 se muestran las correlaciones que se encuentran en la coinfección por dos virus.

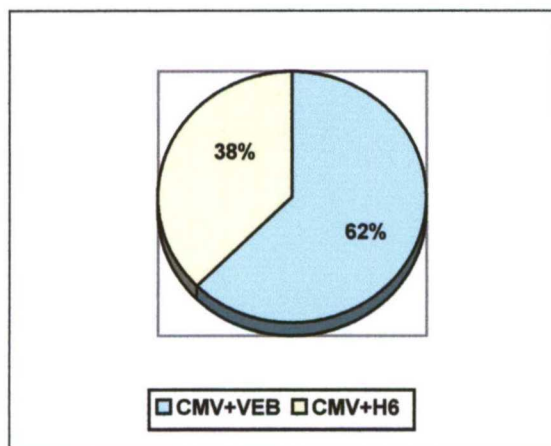


Figura 14.A.

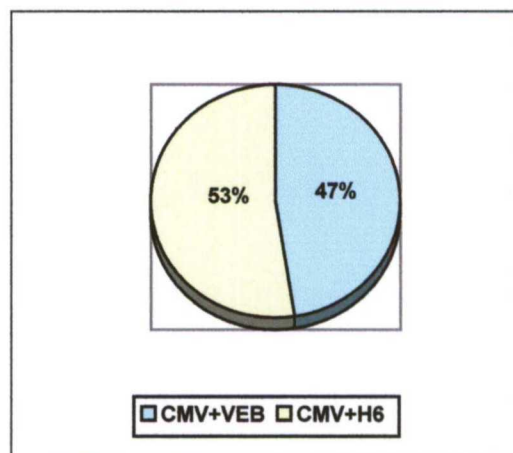


Figura 14.B

Figura 14.

Coinfección entre CMV y VEB o HVH-6 en muestras de A. sangre y B. suero.

La coinfección por CMV y un virus más se ha detectado por PCR *nested* en sangre 41,8% y en suero en el 33,3% con una relación CMV-VEB / CMV-HVH-6, que pasa de 92 (26,1%) / 55 (15,7%) en sangre a 19 (15,8%) / 21 (17,5%) en suero, dando lugar a un aumento de la frecuencia de coinfección a favor de CMV-HVH-6. Pero sin encontrar una diferencia estadísticamente significativa para dicha asociación entre sangre y suero, $p = 0,09$.

Mediante el seguimiento de muestras, de 19 episodios de coinfección en suero en el caso de CMV-VEB, se ha anticipado por la detección de ADN-CMV en 10 casos (52,6%) y por VEB en 9 casos (47,4%). Los 21 casos de coinfección por CMV-HVH-6 en suero se ha precedido por la detección de CMV en 5 casos (23,8%) y por HVH-6 en 16 casos (76,2%).

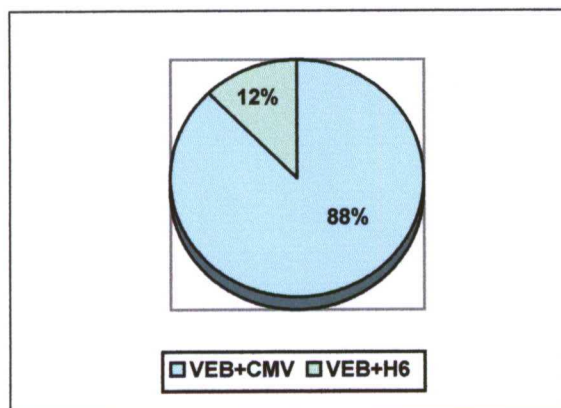


Figura 15.A.

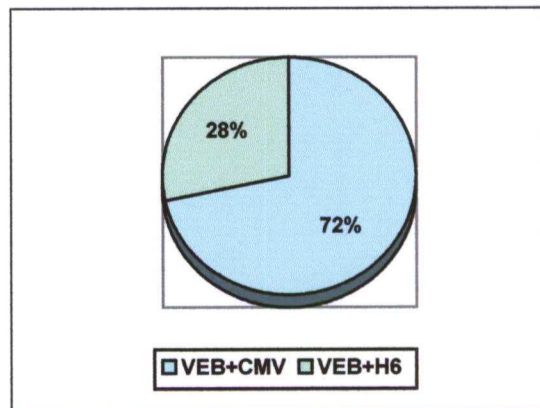


Figura 15.B.

Figura 15.

Coinfección entre VEB y CMV o HVH-6 en muestras de A. sangre y B. suero

La coinfección por VEB y un virus más se ha detectado por PCR *nested* en sangre 53,3% y en suero en el 34,7% con una relación VEB-CMV / VEB-HVH-6; pasa de 92 (46,7%) / 13 (6,6%) en sangre a 19 (26,4%) / 6 (8,3%) en suero, lo que supone una diferencia clínicamente relevante a favor de la coinfección por VEB-HVH-6, pero no significativa estadísticamente, $p = 0,14$.

Mediante el seguimiento de muestras, de 19 episodios de coinfección en suero en el caso de VEB-CMV, se ha anticipado por la detección de ADN-CMV en 10 casos (52,6%) y por VEB en 9 casos (47,4%). La coinfección por VEB-HVH-6 se ha precedido por la detección de cada uno en 3 casos (50%).

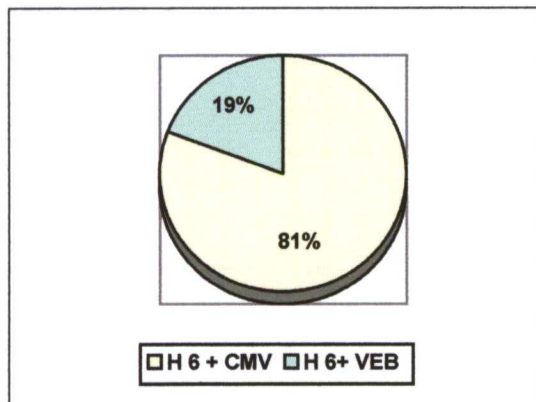


Figura 16.A.

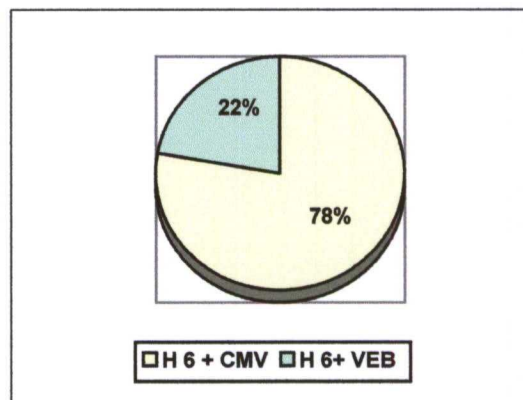


Figura 16.B.

Figura 16.

Coinfección entre HVH-6 y CMV o VEB en muestras de A. sangre y B. suero de enfermos.

La coinfección por HVH-6 y un virus más se ha detectado por PCR *nested* en sangre 50,7% y en suero en el 47,4% con una relación HVH-6-CMV / HVH-6-VEB; pasa de 55 (41%) / 13 (9,7%) en sangre a 21 (36,8%) / 6 (10,5%) en suero, dando lugar a un aumento de la frecuencia de infección a favor de HVH6-VEB. Sin embargo, no se encuentra una diferencia estadísticamente significativa ($p = 0,59$) para la coinfección por virus herpes-6 y CMV, entre las prevalencias en sangre y suero del grupo de enfermos, presentándose en el 41 y del 36,8 % respectivamente.

Considerando estos resultados, se ha procedido al análisis de coinfección en los pacientes durante todo el período de seguimiento y se ha encontrado 21 episodios de coinfección por HVH-6-CMV en suero, en 16 (76,2%) de los cuales se ha detectado ADN de HVH-6 en una muestra anterior al episodio de coinfección y los otros 5 (23,8%) episodios se han precedido por la detección de ADN-CMV. La coinfección por VEB-HVH-6 se ha precedido por la detección de cada uno en 3 casos (50%).

4.A.4. Prevalencias de coinfección sintomática

En la tabla 9, se muestran el número y porcentaje de enfermos en los que se ha detectado por PCR *nested* la coinfección por dos o tres virus en presencia de síntomas compatibles con enfermedad por CMV.

Tabla.9. Número y porcentaje de pacientes con coinfección sintomática y PCR positiva para los 3 virus.

ENFERMOS		CMV	HVH-6	VEB	CMV	HVH-6	VEB
Nº	%	SUERO	SUERO	SUERO	SANGRE	SANGRE	SANGRE
16	57,1	X	X	X	X		
7	25	X	X		X		X
4	14,3	X		X	X	X	
1	3,6	X	X		X		
28	100	28 (100%)	24 (85,7%)	20 (71,4%)	X		

De los 67 pacientes trasplantados renales, 28 presentaron síntomas compatibles con enfermedad por CMV de los cuales 24 (85,7%) recibían tratamiento profiláctico con ganciclovir. El ADN de los 3 virus se ha detectado por PCR *nested* en suero en 16 de estos pacientes (57,1%) que presentaron coinfección sintomática. En otros 11 (39,3%) pacientes con infección sintomática, se detectaron 2 virus en suero y el tercero en sangre total, de los cuales 7 (63,6%) pacientes presentaron una coinfección sintomática por CMV-HVH-6 en suero y VEB en sangre total y 4 (36,4%) pacientes presentaron coinfección sintomática por CMV-VEB en suero y HVH-6 en sangre total. En 1 caso (3,6%) se detectó sólo el ADN de CMV-HVH-6 en suero. En ningún caso de coinfección

sintomática se detectó el ADN de solo VEB-HVH-6 en suero. En el total de enfermos con infección sintomática por CMV, el ADN-CMV fue detectado en el suero de los 28 enfermos (100%), el ADN-VEB en 20 (71,4%) y el HVH-6 en 24 (85,7%).

4.B. Hibridación

El resultado de la hibridación de las muestras positivas, por PCR *nested* en sangre y suero con las sondas específicas biotiniladas se detallan en la tabla siguiente.

Tabla.10. Porcentaje de positividad por hibridación en las muestras positivas por PCR *nested*, en sangre y suero de enfermos y donantes de sangre.

VIRUS	ENFERMOS		DONANTES	
	Sangre	Suero	Sangre	Suero
CMV	96,3%	95,8%	100%	100%
VEB	95,9%	95,8%	95,4%	100%
HVH-6	96,3%	94,7	100%	-

En enfermos, del total de 352 muestras para CMV, positivas por PCR *nested* en sangre, 339 fueron positivas por hibridación, lo que corresponde al 96,3% y 13 (3,7%) fueron negativas. En suero, del total de 120 muestras positivas, 115 dieron positivo por hibridación, lo que corresponde al 95,8% y 5 (4,2%) dieron un resultado negativo. Del total de 197 muestras para VEB, positivas por PCR *nested* en sangre, 189 fueron positivas por hibridación, lo que corresponde al 95,9% y 8 (4,1%) fueron negativas. En suero, del total de 72 muestras positivas, 69 dieron positivo por hibridación, lo que corresponde al 95,8% y 3 (4,2%) dieron un resultado negativo. Del total de 134 muestras para VH-6,

positivas por PCR *nested* en sangre, 129 fueron positivas por hibridación, lo que corresponde al 96,3% y 5 (3,7%) fueron negativas. En suero, del total de 57 muestras positivas, 54 dieron positivo por hibridación, lo que corresponde al 94,7% y 3 (5,3%) dieron un resultado negativo.

En el grupo control, las 38 muestras para CMV, positivas por PCR *nested* en sangre, fueron positivas por hibridación, lo que corresponde al 100%. En suero, las 3 muestras positivas dieron positivo por hibridación, lo que corresponde al 100%. Del total de 22 muestras para VEB, positivas por PCR *nested* en sangre, 21 fueron positivas por hibridación, lo que corresponde al 95,4% y 1 (4,6%) fue negativa. En suero, las 2 muestras positivas dieron positivo por hibridación, lo que corresponde al 100%. El total de 14 muestras para VHV-6, positivas por PCR *nested* en sangre fueron positivas por hibridación, lo que corresponde al 100%.

4.C. Comparación de resultados de PCR *nested* con otras técnicas de diagnóstico

A continuación se procede a la comparación de los resultados obtenidos por PCR *nested* con los resultados de otras técnicas diagnósticas que se utilizan habitualmente en el laboratorio de Microbiología del Hospital Clínico de San Carlos.

4.C.1. Comparación de resultados entre PCR *nested* en sangre y suero con la detección de anticuerpos específicos frente a CMV y VEB

I- Comparación de las prevalencias por la PCR *nested* y serología

En la tabla 11, se exponen los resultados obtenidos por PCR *nested* y la detección de IgG e IgM anti-CMV tanto en los enfermos como en el total de las muestras estudiadas.

Tabla 11. Estudio comparativo de la prevalencia de ADN y de los anticuerpos IgG e IgM frente a CMV y VEB.

	ENFERMOS				MUESTRAS			
	SANGRE	SUERO	IgG	IgM	SANGRE	SUERO	IgG	IgM
CMV	97,0	74,6	95,5	35,8	65,7	22,4	94,6	12,8
VEB	92,5	64,2	35,8	11,9	36,8	13,4	22,4	2,8

En el grupo de enfermos, el ADN-CMV se ha detectado al menos en una muestra por PCR *nested* en sangre en el 97% de enfermos y por PCR *nested* en suero en el 74,6%. La IgG específica fue positiva en el 95,5%, no encontrándose una diferencia estadísticamente significativa con los resultados de PCR *nested* en sangre, $p = 1$. La IgM específica fue positiva en el 35,8%, hallándose una diferencia estadísticamente significativa con los resultados de PCR *nested* en suero, $p < 0,001$.

El ADN-VEB se ha detectado en el 92,5% y 64,2% por PCR *nested* en sangre y en suero respectivamente. Las IgG e IgM específicas fueron positivas en el 35,8% y 11,9% de enfermos respectivamente. Se ha encontrado una diferencia estadísticamente significativa entre los resultados de PCR *nested* en sangre y los de IgG, como también entre los resultados de PCR *nested* en suero y la detección de IgM.

En las muestras, el ADN de CMV fue detectado en el 65,7% y 22,4% respectivamente por PCR *nested* en sangre y en suero. La seropositividad de las IgG e IgM anti-CMV fue del 94,6% y del 12,8% respectivamente. En el caso de VEB, la PCR *nested* fue positiva en el 36,8% y 13,4% en sangre y suero respectivamente, y las IgG e IgM específicas fueron detectadas en el 22,4% y 2,8% respectivamente. Se encontró una diferencia entre los resultados de PCR *nested* en suero y la detección de IgM, $p < 0,001$ para ambos virus herpes.

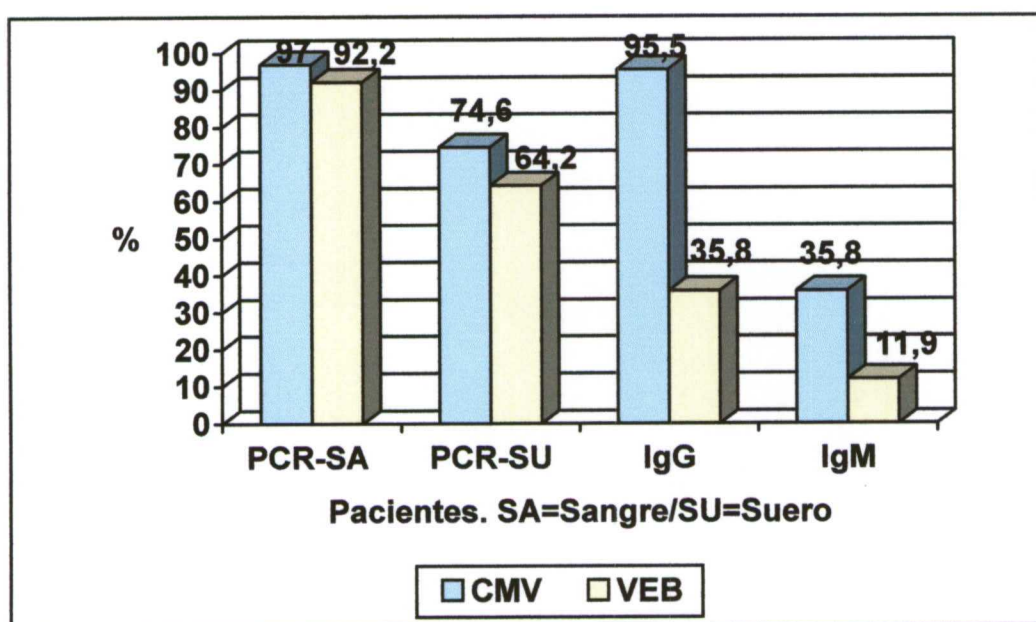


Figura 17.

Infección por CMV y VEB detectada por la PCR nested o la serología en el grupo de enfermos.

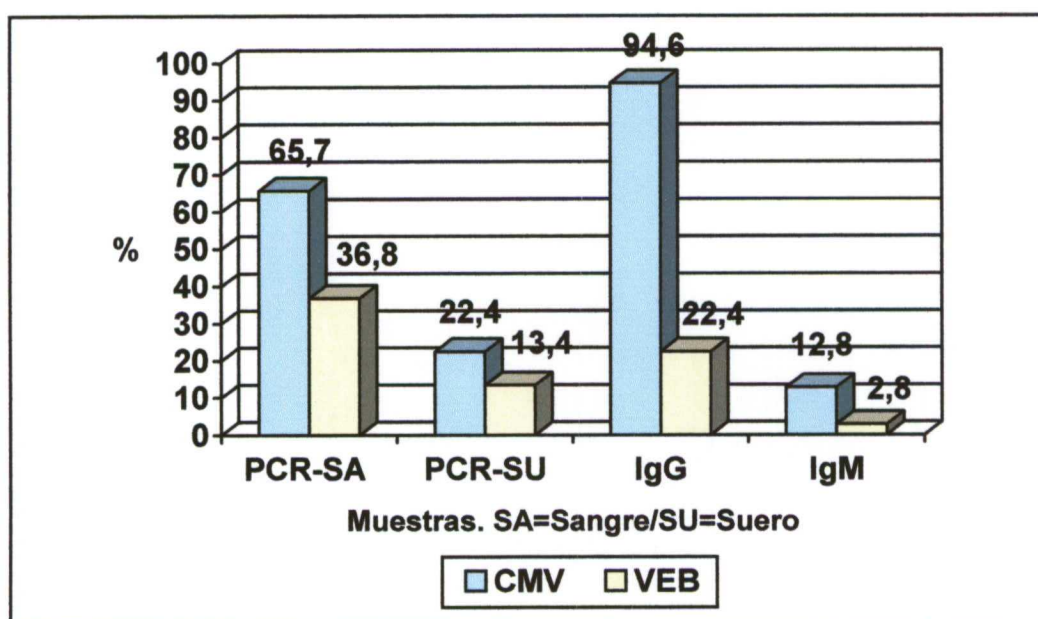


Figura 18.

CMV y VEB: porcentaje de positividad para la PCR nested y para la serología en el grupo de enfermos.

II. Concordancia de resultados entre la PCR nested y la serología para la detección de CMV y VEB

En la tabla 12, se presentan las comparaciones pareadas de los resultados de PCR nested y la serología de CMV y VEB.

Tabla 12. Concordancia y discordancia de resultados entre PCR nested y la serología.

VIRUS	PRUEBAS	%CONCORDANCIA	%DISCORDANCIA		P ⁽¹⁾	K ⁽²⁾
			PCR+/Ig-	Ig+/PCR-		
CMV	PCR-SANGRE/IgG	69,6%	0,7%	29,7%	0,001	0,16
CMV	PCR-SUERO/IgM	76,7%	16,4%	6,9%	0,001	0,21
VEB	PCR-SANGRE/IgG	71,1%	21,6%	7,3%	0,001	0,32
VEB	PCR-SUERO/IgM	73,5%	9,7%	0,8%	0,001	0,19

⁽¹⁾ TEST de MAC NEMAR

⁽²⁾ Indice Kappa

Para la detección de CMV, entre la PCR nested en sangre y la detección de IgG anti CMV, se encuentra un porcentaje de concordancia del 69,6% y una discordancia con PCR *nested* positiva en el 0,7% e IgG positiva en el 29,7%, $p < 0,001$, $K = 0,16$. Entre PCR *nested* en suero y la detección de IgM específica, hay una concordancia del 76,7% y una discordancia con PCR *nested* positiva en el 16,4% e IgM positiva en el 6,9%, $p < 0,001$, $K = 0,21$.



Para la detección de VEB, entre la PCR nested en sangre y la detección de IgG anti CMV, se encuentra un porcentaje de concordancia del 71,1% y una discordancia con PCR *nested* positiva en el 21,6% e IgG positiva en el 7,3%, $p < 0,001$, $K = 0,32$. Entre PCR *nested* en suero y la detección de IgM específica, hay una concordancia del 73,5% y una discordancia con PCR *nested* positiva en el 9,7% e IgM positiva en el 0,8%, $p < 0,001$, $K = 0,19$.

4.C.2. Comparación de resultados de diferentes técnicas para la detección de CMV

Antes del trasplante, solo el 10,4% (7) de los pacientes fueron seronegativos para CMV.

I. Prevalencias de CMV en sangre por la PCR nested, la Antigenemia y el cultivo y en suero por la PCR nested y la detección de IgM específica.

Tabla 13. Número y porcentaje de enfermos en los que cada prueba ha detectado al menos una muestra positiva y los correspondientes en el total de muestras.

	Total	PCR-SANGRE		PCR-SUERO		ANTIGENEMIA		CULTIVO		CMV-IgM	
		Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Pacientes	67	65	97,0	50	74,6	33	49,3	20	29,9	24	35,5
Muestras	536	352	65,67	120	22,4	54	10,1	25	4,7	69	12,8

CMV se detectó por PCR *nested* en sangre en 65 (97%) enfermos, que correspondió a 352 (65,67%) muestras positivas. Por PCR *nested* en suero se detectó en 50 (74,6%) enfermos, que correspondió a 120 (22,4%) muestras positivas. Por antigenemia se detectó en 33 (49,3%) enfermos, que correspondió a 54 (10,1%) muestras. Por cultivo se detectó en 20 (29,9%) enfermos, que correspondió a 25 (4,7%), y se detectó IgM en 24 (35,5%) enfermos, que correspondió a 69 (12,8%).

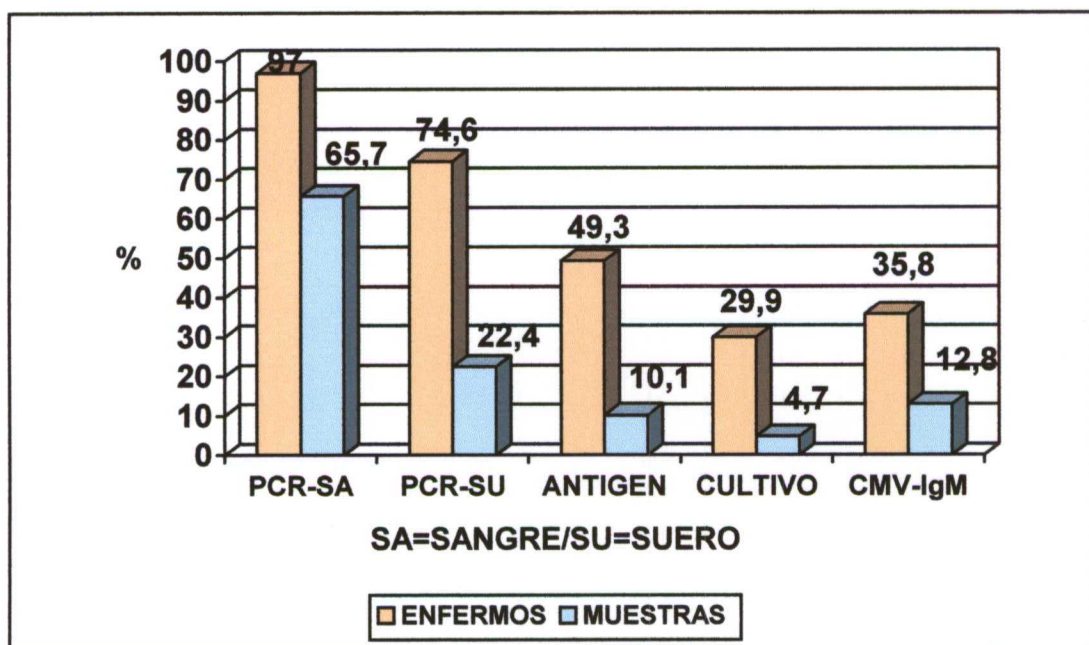


Figura 19.

Porcentaje de pacientes que presentaron infección por CMV y el correspondiente % de muestras positivas según las diferentes técnicas de diagnóstico.

II- Concordancia de resultados de las diferentes técnicas utilizadas para el diagnóstico de infección por CMV

En la tabla 14, se presentan las comparaciones pareadas de los resultados de PCR *nested* y los obtenidos por otras técnicas que se utilizan habitualmente para el diagnóstico de infección por CMV.

Tabla 14. Porcentajes de concordancia y discordancia de resultados entre PCR *nested* en suero y otras pruebas de diagnóstico para CMV.

Prueba: A	Prueba: B	% CONCORDANCIA	% DISCORDANCIA		P	K
			A + / B -	B + / A -		
PCR-Suero	Cultivo	82,3%	17,7%	0%	<0,001	0,29
PCR-Suero	IgM	76,7%	16,4%	6,9%	<0,001	0,21
PCR-Suero	Antigenemia	85,5%	13,4%	1,1%	<0,001	0,47
PCR-Suero	PCR-Sangre	51,6%	2,1%	46,3%	<0,001	0,18

En la detección de CMV, entre las pruebas de PCR *nested* en suero y el cultivo, se da un porcentaje de concordancia del 82,3% y una discordancia con PCR *nested* positiva en el 17,7%, $p < 0,001$ y $K = 0,29$. Entre las pruebas de PCR *nested* en suero y la detección de IgM anti-CMV, se da un porcentaje de concordancia del 76,7% y una discordancia con PCR *nested* positiva en el 16,4% e IgM específica positiva en el 6,9%, $p < 0,001$ y $K = 0,21$. Entre las pruebas de PCR *nested* en suero y la Antigenemia, se da un porcentaje de concordancia del 85,5% y una discordancia con PCR *nested* positiva en el 13,4% y la Antigenemia positiva en el 1,1%, $p < 0,001$ y $K = 0,47$. Entre las pruebas de PCR *nested* en suero y la PCR *nested* en sangre, se da un porcentaje de concordancia del

51,6% y una discordancia con PCR *nested* en suero positiva en el 2,1% y PCR *nested* en sangre positiva en el 45,3%, $p < 0,001$ y $K = 0,18$.

III. Concordancia entre los resultados de las pruebas diagnósticas y la sospecha clínica

Del total de 67 enfermos, 28 (41,8%) han presentado síntomas compatibles con enfermedad por CMV.

Tabla 15. Porcentajes de concordancia y discordancia entre las pruebas de diagnóstico para la detección de CMV y los síntomas.

Prueba: A	Prueba: B	Enfermos con síntomas / Prueba +	% CONCORDANCIA MUESTRAS	% DISCORDANCIA MUESTRAS		P	K
				A + / B -	B + / A -		
PCR-Suero	Clínica	28/50	83,0%	11,6%	5,4%	<0,001	0,46
Cultivo	Clínica	13/20	84,7%	1,9%	13,4%	<0,001	0,21
IgM	Clínica	19/24	89,9%	3,4%	6,7%	<0,001	0,60
Antigenemia	Clínica	20/33	85,3%	4,3%	10,4%	<0,001	0,36

Entre las pruebas de PCR *nested* en suero y la sospecha clínica, se da un porcentaje de concordancia del 83% y una discordancia con PCR *nested* positiva en el 11,6%, sospecha clínica positiva en el 5,4%, $p < 0,001$ y $K = 0,46$. Entre las pruebas del cultivo y la sospecha clínica, se da un porcentaje de concordancia del 84,7% y una discordancia con cultivo positivo en el 1,9% y sospecha clínica positiva en el 13,4%, $p < 0,001$ y $K = 0,21$. Entre la detección de IgM específica y la sospecha clínica, se da un

porcentaje de concordancia del 89,9% y una discordancia con IgM anti-CMV positiva en el 3,4% y la sospecha clínica positiva en el 6,7%, $p < 0,001$ y $K = 0,60$. Entre las pruebas de Antigenemia y la sospecha clínica, se da un porcentaje de concordancia del 85,3% y una discordancia antigenemia en suero positiva en el 4,3% y la sospecha clínica positiva en el 10,4%, $p < 0,001$ y $K = 0,36$.

4.D. Grupo de enfermos seronegativos para CMV en el pretrasplante y su evolución

La evolución serológica, clínica y los resultados de las diferentes técnicas de diagnóstico en este grupo de enfermos se detallan en la tabla 16.

Tabla.16. Diagnóstico y evolución de los enfermos seronegativos en el pretrasplante renal

Estado serológico (IgG) Pretrasplante		Sero- conversión	IgM	Cultivo	Antigenemia	PCR sangre	PCR suero	Clínica
Donante	Receptor							
-	-	No	-	-	-	-	-	-
-	-	No	-	-	-	-	-	-
-	-	No	-	-	-	+	-	-
+	-	Sí	+	-	-	+	+	-
+	-	Sí	-	-	-	+	-	-
+	-	Sí	-	+	+	+	+	-
+	-	Sí	+	-	+	+	+	+

No se ha producido una seroconversión en los tres pacientes seronegativos cuyos donantes fueron seronegativos. Solo uno presentó un resultado positivo por PCR *nested* en sangre. El resto de las pruebas de diagnóstico fueron negativas y ninguno presentó una sospecha clínica de infección por CMV.

Se ha producido una seroconversión por la detección de IgG específica en 4 de los cuatro pacientes seronegativos cuyos donantes fueron seropositivos. Se detectó IgM específica en dos pacientes, uno de estos 4 pacientes dió un resultado positivo por cultivo, dos por la Antigenemia , 3 por PCR *nested* en suero y los 4 por PCR *nested* en sangre. Sólo uno ha presentado una sospecha clínica de infección por CMV.

4.E. Índices de validez de criterios de las técnicas de diagnóstico para la detección de CMV

I. Al considerar el cultivo como la técnica de referencia

En las tablas 17 y 18 se presentan los índices de validez de criterios de las técnicas diagnósticas cuando se toman todos los valores de cultivo como verdaderos positivos y verdaderos negativos.

Tabla 17. Sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo de cada técnica cuando se considera el cultivo de *shell-vial* como la técnica de referencia.

PRUEBA	SENSIBILIDAD	ESPECIFICIDAD	VALOR PREDICTIVO POSITIVO	VALOR PREDICTIVO NEGATIVO
DETECCIÓN DE IgM	16,0	87,3	5,8	95,5
I.C. AL 95%	5,3 – 36,9	84,0 – 90,0	1,9 – 14,9	93,0 – 97,1
ANTIGENEMIA	84,0	93,5	38,9	99,1
I.C. AL 95%	83,0 – 94,7	90,9 – 95,4	26,2 – 53,1	97,7 – 99,7
PCR nested SANGRE	100	36,0	7,1	100
I.C AL 95%	83,4 – 99,6	31,8 – 40,3	4,7 – 10,4	97,5 – 99,9
PCR <i>nested</i> SUERO	100	81,4	20,8	100
I.C AL 95%	83,4 – 99,6	77,7 – 84,6	14,1 – 29,4	98,9 – 99,9

Cuando se considera el cultivo como la técnica de referencia, tabla 17, la técnica de mayor sensibilidad fue la PCR nested, tanto en sangre como en suero, que fue del 100% con intervalo de confianza (I.C.) al 95% entre 83,4-99,6%, luego la antigenemia con una sensibilidad del 84% con I.C. al 95% entre 83-94,7%. La prueba con una sensibilidad más baja fue la detección de IgM específica y fue del 16% con I.C. al 95% entre 5,3-36,9%.

En cuanto a los valores de la especificidad, la prueba con valores más altos correspondió a la antigenemia con una especificidad del 93,5% con un I.C. entre 90,9-95,4%. La siguiente fue la detección de IgM específica con una especificidad del 87,3% con I.C. entre 84-90%. Luego fue la PCR nested en suero con una especificidad del

81,4% con I.C. al 95% entre 77,7-84,6%. La prueba menos específica correspondió a la PCR nested en sangre con una especificidad del 36% con I.C. al 95% entre 31,8-40,3%.

La prueba que ha tenido un valor predictivo positivo más alto fue la antigenemia alcanzando el 38,9% con un I.C. al 95% entre 26,2-53,1%, seguida de la PCR en suero con un valor predictivo positivo del 20,8% con un I.C. al 95% entre 14,1-29,4%, luego fue la PCR nested en sangre con un valor predictivo positivo del 7,1% con un I.C. al 95% entre 4,7-10,4%. La prueba con un valor predictivo positivo más bajo correspondió a la detección de IgM específica y fue del 5,8% con un I. C al 95% entre 1,9-14,9%.

El valor predictivo negativo más alto correspondió a la prueba de PCR nested, tanto en sangre como en suero, y fue del 100% para ambas con un I.C. al 95% entre 97.5-99,9% y 98,9-99,9% respectivamente. La siguiente fue la antigenemia con un valor predictivo negativo del 99,1% con un I.C. al 95% entre 97,7-99,7%. El valor predictivo negativo más bajo correspondió a la detección de IgM y fue del 95,5% con un I.C. al 95% entre 93-97,1%.

Tabla 18. Valor global, odds ratio, razón de verosimilitud positiva y razón de verosimilitud negativa de cada técnica cuando se considera el cultivo de *shell-vial* como la técnica de referencia.

PRUEBA	VALOR ^(a) GLOBAL	ODDS RATIO	RAZÓN DE VEROSIMILITUD POSITIVA ^(b)	RAZÓN DE VEROSIMILITUD NEGATIVA
DETECCIÓN DE IgM	84,0	1,3	1,3	0,9
I.C. AL 95%	80,5 – 86,9	0,4 – 3,9	0,5 – 3,1	0,8 – 1,0
ANTIGENEMIA	93,0	76,0	13,0	0,2
I.C. AL 95%	90,5 – 95,0	24,7 – 234,5	8,9 – 18,8	0,0 – 0,4
PCRnested Sangre	38,9	Indeterminado	1,6	0,0
I.C AL 95%	34,8 – 43,3		1,5 – 1,7	
PCR <i>nested</i> SUERO	82,3	Indeterminado	5,4	0,0
I.C AL 95%	78,7 – 85,4		4,5 – 6,4	

^(a) proporción observada del acuerdo, de todos los positivos y negativos del total.

^(b) expresa la cantidad de veces que es más probable hallar un resultado positivo en un individuo enfermo que en uno sano.

Teniendo en cuenta las consideraciones de las tablas 17 y 18, la prueba que presentó el valor global más alto fue la antigenemia: 93% con un I.C. al 95% entre 90,5-95,4%. La siguiente fue la detección de IgM específica cuyo valor fue del 84% y con I.C. al 95% entre 80,5-86,9%. La siguiente fue la PCR *nested* en suero cuyo valor global fue del 82,3% con un I.C. al 95% entre 78,7-85,4%. La prueba que presentó un valor global más bajo fue la PCR *nested* en sangre cuyo valor fue del 38,9% con un I.C. al 95% entre 34,8-43,3%.

La estimación del riesgo mediante odds ratio por la Antigenemia: fue del 76% con I.C. al 95% entre 24,7-234,5%, detección de IgM específica: 1,3% con I.C. al 95% entre 0,4-3,9%, e indeterminado por PCR *nested* en suero y sangre. La razón de verosimilitud positiva, por orden decreciente fue: antigenemia 13 con un I.C. al 95% entre 8,9-18,8. PCR *nested* en suero: 5,4 con un I.C. al 95% entre 4,5-6,4. PCR *nested* en sangre: 1,6 con un I.C. entre 1,5-1,7 y por detección de IgM específica: 1,3 con un I.C. al 95% entre 0,5-3,1. La razón de verosimilitud negativa fue 0,9 para la detección de IgM con I.C. entre 0,8-1. Para la Antigenemia fue 0,2 con un I.C. entre 0-0,4. Para la PCR *nested* en sangre y en suero fue de 0.

II. Al considerar la PCR *nested* en suero como la técnica de referencia

En las tablas 19 y 20, se presentan los índices de validez de criterios de las técnicas diagnósticas cuando se considera la PCR *nested* en suero como la técnica de referencia ya que fue la que presentó los mayores índices de positividad.

Tabla 19 Sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo de cada técnica cuando se considera la PCR *nested* en suero como la técnica de referencia.

PRUEBA	SENSIBILIDAD	ESPECIFICIDAD	VALOR PREDICTIVO POSITIVO	VALOR PREDICTIVO NEGATIVO
SHELL VIAL	20,8	100	100	81,4
I.C. AL 95%	14,2 – 29,4	98,9 – 100	83,4 – 99,6	77,7 – 84,6
DETECCIÓN DE IgM	26,7	91,1	46,4	81,2
I.C. AL 95%	19,2 – 35,7	87,8 – 93,6	34,4 – 58,7	77,2 – 84,5
ANTIGENEMIA	39,2	98,3	87,0	8,9
I.C. AL 95%	30,5 – 48,5	96,4 – 99,2	74,5 – 94,2	81,3 – 87,9
PCR nested SANGRE	89,2	41,1	30,4	92,9
I.C. AL 95%	81,9 – 93,9	36,4 – 46,0	25,7 – 35,5	88,0 – 96,0

Cuando se consideran todos los valores obtenidos por la prueba de PCR *nested* en suero como la técnica de referencia, tabla 19, la técnica de mayor sensibilidad fue la PCR *nested* en sangre, que fue del 89,2% con intervalo de confianza (I.C.) al 95% entre 81,9-93,9%, luego la antigenemia con una sensibilidad del 39,2% con I.C. al 95% entre 30,5-48,5%. La sensibilidad de la detección de IgM específica fue del 26,7% con I.C. al 95% entre 19,2-35,7%. La prueba con una sensibilidad más baja fue el cultivo con una sensibilidad de 20,8 con un I.C. al 95% fue entre 14,2-29,4%.

En cuanto a los valores de la especificidad, la prueba con valores más altos correspondió al cultivo cuyo valor fue del 100% con un I.C. entre 98,9-100%. La siguiente fue la antigenemia con una especificidad del 98,3% con un I.C. entre 96,4-99,2%. La siguiente fue la detección de IgM específica con una especificidad del 91,1%

con I.C. entre 87,8-93,6%. La prueba menos específica correspondió a la PCR nested en sangre con una especificidad del 41,1% con I.C. al 95% entre 36,4-46,6%.

La prueba que ha tenido un valor predictivo positivo más alto fue el cultivo alcanzando el 100% con un I.C. al 95% entre 83,4-99,6%, seguida por la antigenemia con un valor predictivo positivo del 87% con un I.C. al 95% entre 74,5-94,2%, luego fue la detección de IgM específica con un valor predictivo positivo del 46,4% con un I.C. al 95% entre 34,4-58,7%. La prueba con un valor predictivo positivo más bajo correspondió a la prueba de PCR nested en sangre con un valor predictivo positivo del 30,4% con un I.C. al 95% entre 25,7-35,5%.

El valor predictivo negativo más alto correspondió a la prueba de PCR nested en sangre y fue del 92,9% con un I.C. al 95% entre 88-96%. La siguiente fue la antigenemia con un valor predictivo negativo del 84,9,1% con un I.C. al 95% entre 81,3-87,9%. La siguiente fue el cultivo cuyo valor predictivo negativo fue del 81,4% con un I.C. entre 77,7-84,6%. El valor predictivo negativo más bajo correspondió a la detección de IgM y fue del 81,2% con un I.C. al 95% entre 77,2-84,5%.

Tabla 20. Valor global, odds ratio, razón de verosimilitud positiva y razón de verosimilitud negativa de cada técnica cuando se considera la PCR nested en suero como la técnica de referencia.

PRUEBA	VALOR GLOBAL	ODDS RATIO	RAZÓN DE VEROSIMILITUD POSITIVA	RAZÓN DE VEROSIMILITUD NEGATIVA
SHELL VIAL I.C. AL 95%	82,2 78,7 – 85,4	Indeterminado	Indeterminado	0,8 0,7 – 0,9
DETECCIÓN DE IgM	76,7 72,8 – 80,1	3,7 2,2 – 6,3	3,0 2,0 – 4,6	0,8 0,7 – 0,9
ANTIGENEMIA I.C AL 95%	85,1 81,7 – 87,9	Indeterminado	23,3 10,8 – 50,2	0,6 0,5 – 0,7
PCR ^{nested} Sangre I.C AL 95%	51,9 47,5 – 56,2	Indeterminado	1,5 1,4 – 1,7	0,3 0,2 – 0,4

Teniendo en cuenta las consideraciones de las tablas 19 y 20, la prueba que presentó el valor global más alto fue la antigenemia: 85,1% con un I.C. al 95% entre 81,7-87,9%. La siguiente fue el cultivo, 82,2% con un I.C. entre 78,7-85,4. Luego fue la detección de IgM específica cuyo valor fue del 76,7% y con I. C. al 95% entre 72,8-80,1%. La prueba que presentó un valor global más bajo fue la PCR nested en sangre cuyo valor fue del 51,9% con un I.C. al 95% entre 47,5-56,2%.

La estimación del riesgo mediante odds ratio para la detección de IgM específica: 3,7% con I.C. al 95% entre 2,2-6,3%, y para el resto de las pruebas fue indeterminado.

La razón de verosimilitud positiva, por orden decreciente fue: antigenemia 23,3% con un I.C. al 95% entre 10,8-50,2. Detección de IgM: 3% con un I.C. al 95% entre 2-

4,6%. PCR nested en sangre: 1,5 con un I.C. entre 1,4-1,7% y fue indeterminado para el cultivo. La razón de verosimilitud negativa fue 0,8 el cultivo con un I.C. al 95% entre 0,7-0,9 presentando el mismo valor la detección de IgM. Para la antigenemia fue 0,6 con un I.C. entre 0,5-0,7. Para la PCR nested en sangre fue del 0,3 con un I.C. al 95% entre 0,2-0,4.

4.F. PCR cuantitativa en el diagnóstico de la infección sintomática y asintomática por CMV

De las 536 muestras de sangre, se ha seleccionado aleatoriamente 90 muestras en las que se ha determinado el ADN-CMV por una PCR cuantitativa en tiempo real según las instrucciones de la casa comercial Rotor Gene. El número de copias / ug de ADN total osciló entre 0 y 115,496.

4.F.1. Correlación de la carga viral con la clínica y el tratamiento

De estas 90 muestras de sangre, 77 muestras pertenecían a pacientes que estaban sometidos a un tratamiento profiláctico con ganciclovir en el momento de realizar la PCR cuantitativa. De las 77 muestras, 15 fueron de pacientes que presentaban una sospecha de enfermedad por CMV y el rango de la carga viral en estas muestras osciló entre 0 - 36380 copias / ug de ADN total, y 62 muestras de pacientes que no presentaban sospecha clínica de enfermedad en las que el rango de la carga viral osciló entre 0 - 115495 copias / ug de ADN total. Mediante la prueba de Mann-Whitney, la mediana de la carga viral obtenida en enfermos con sospecha de enfermedad por CMV, observada de forma retrospectiva, fue de 4845 copias / ug de ADN y la mediana de la carga viral obtenida en enfermos que no presentaban sospecha de enfermedad por CMV fue de 18 copias/ ug de ADN. ($p < 0,001$).

De las otras 13 muestras que fueron de pacientes que no recibían tratamiento antiviral en el momento de realizar la PCR cuantitativa, 3 pertenecían a pacientes que habían recibido ganciclovir con anterioridad. La mediana de carga viral en estas muestras fue de 948 copias/ ug de ADN. Las otras 10 muestras fueron de pacientes que no presentaban sospecha clínica de enfermedad por CMV y no recibieron tratamiento antiviral. La mediana de carga viral en estas muestras fue de 0 copias / ug de ADN. ($p < 0,001$).

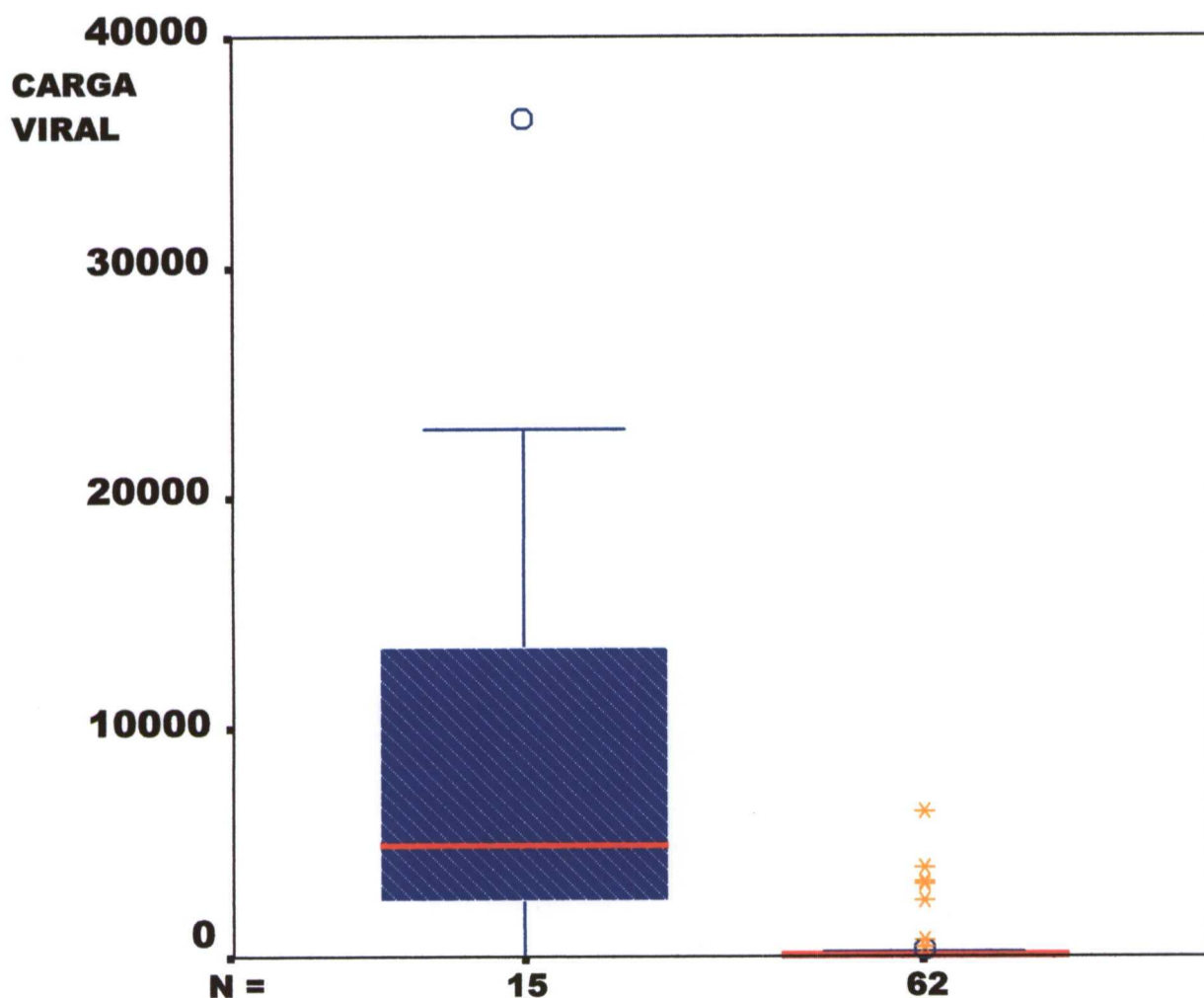


Figura 20.

Comparación de la carga viral entre infección sintomática y no sintomática por CMV.

4.F.2. Comparación de PCR cuantitativa con las diferentes técnicas de diagnóstico

Se han utilizado las curvas del rendimiento diagnóstico (ROC) y el punto de corte que mejor discrimina la presencia del virus para todas las pruebas de diagnóstico para realizar la comparación entre ellas.

I. Comparación de PCR cuantitativa con PCR *nested* en suero

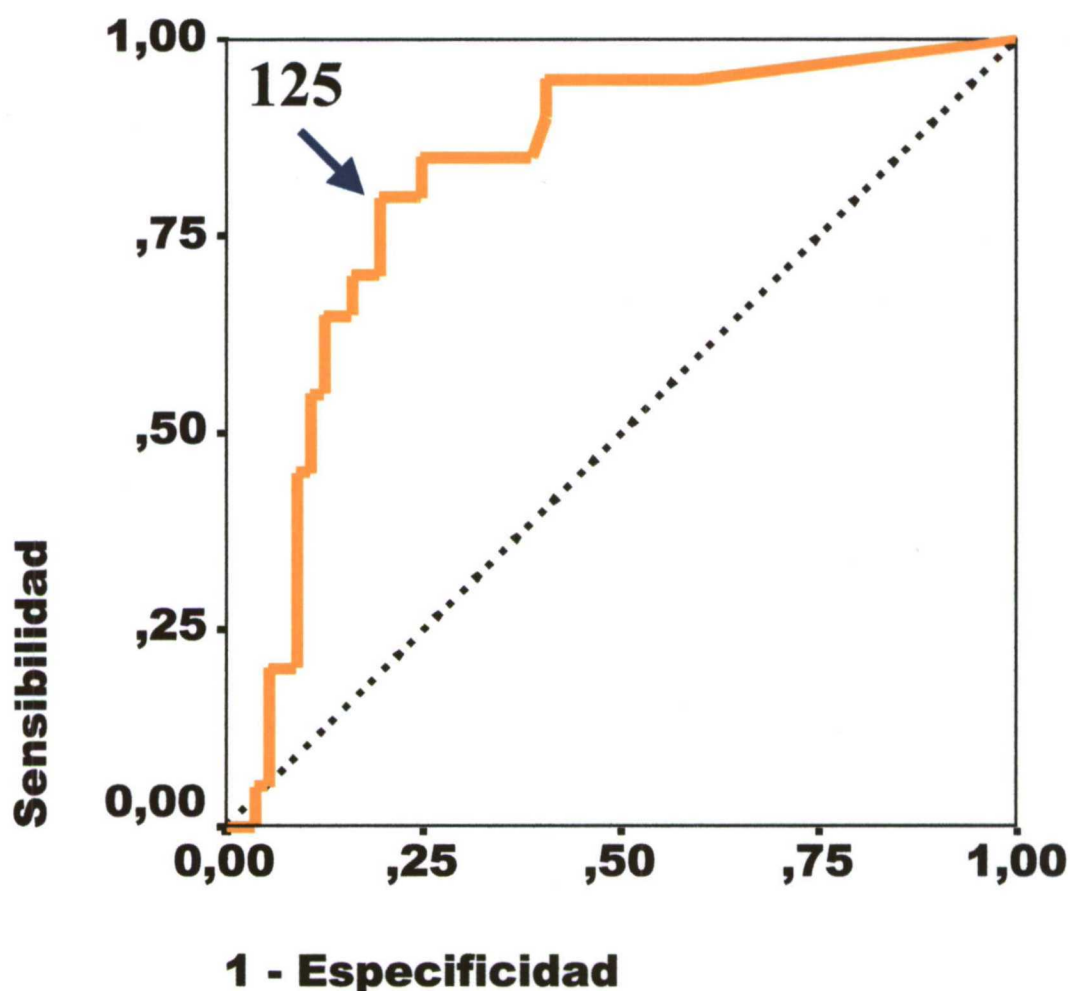


Figura 21.

Probabilidad de detección del ADN-CMV por PCR *nested* en suero y el punto de corte óptimo correspondiente a la carga viral.

El área bajo la curva representa la capacidad de la PCR *nested* en suero para discriminar la presencia de infección activa por CMV. El área fue de 0,83 (I.C. al 95% entre 0,72-0,93) $p < 0,0001$. El punto de corte óptimo fue de 125 copias / ug de ADN total que corresponde al punto discriminatorio de máxima sensibilidad y especificidad.

II- Comparación PCR cuantitativa con la antigenemia

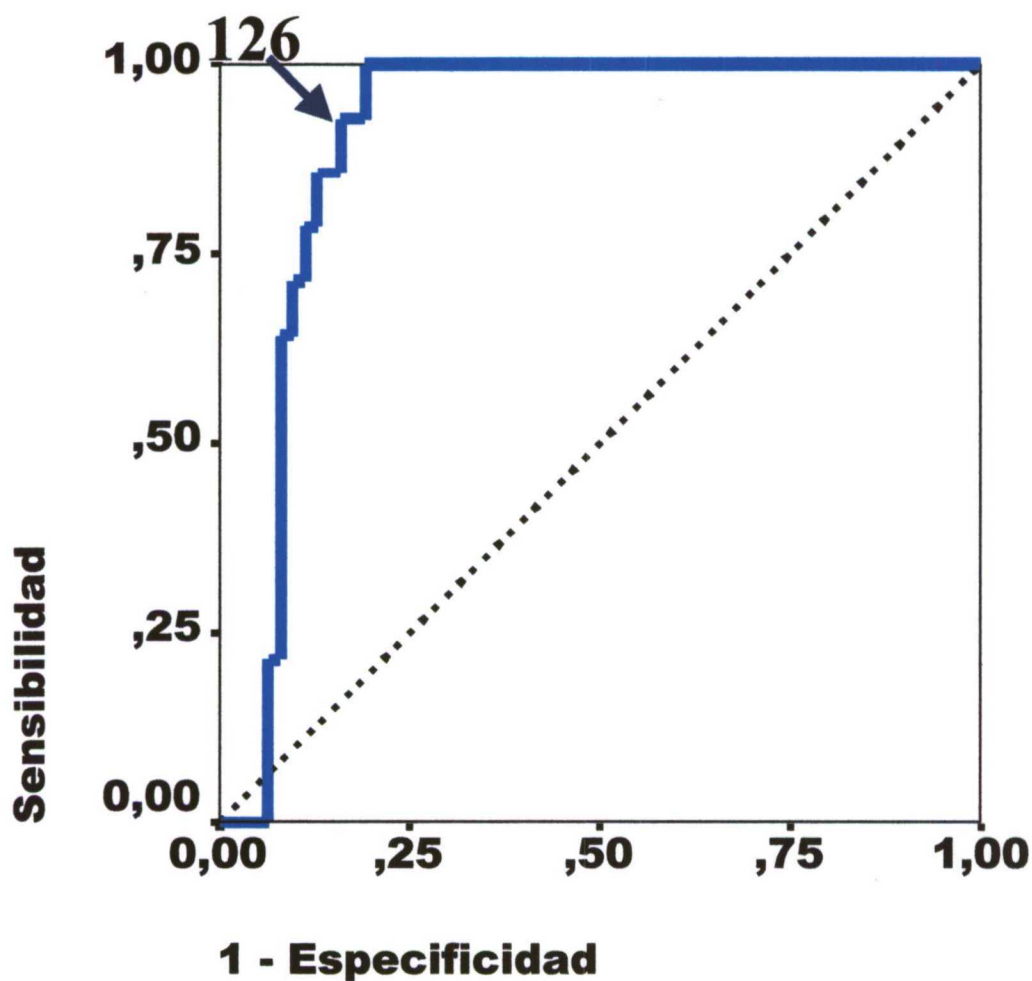


Figura 22.

Probabilidad de detección de CMV por la antigenemia y el punto de corte óptimo correspondiente a la carga viral.

El área bajo la curva para la antigenemia fue de 0,90 (I.C. al 95% entre 0,83-0,97) $p < 0.0001$. El punto de corte óptimo fue de 126 copias / μg de ADN total que corresponde al punto discriminatorio de máxima sensibilidad y especificidad.

III- Comparación PCR cuantitativa con el cultivo

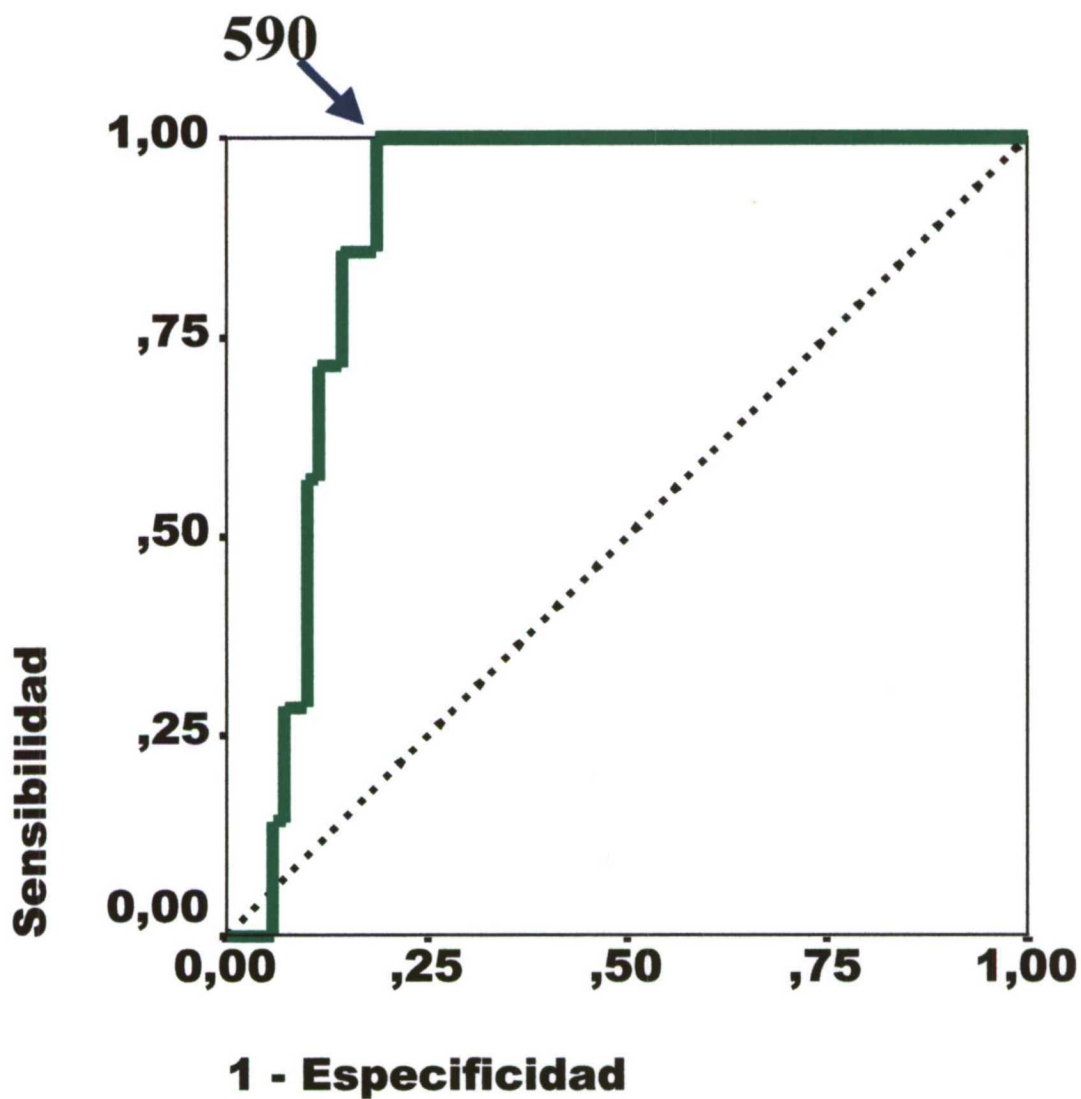


Figura 23.

Probabilidad de detección de CMV por el cultivo y el punto de corte óptimo correspondiente a la carga viral.

El área bajo la curva para el cultivo fue de 0,89 (I.C. al 95% entre 0,81-0,96) $p < 0,001$. El punto de corte óptimo fue de 590 copias / ug de ADN total que corresponde al punto discriminatorio de máxima sensibilidad y especificidad.

IV- Comparación de la PCR cuantitativa con la detección de IgM

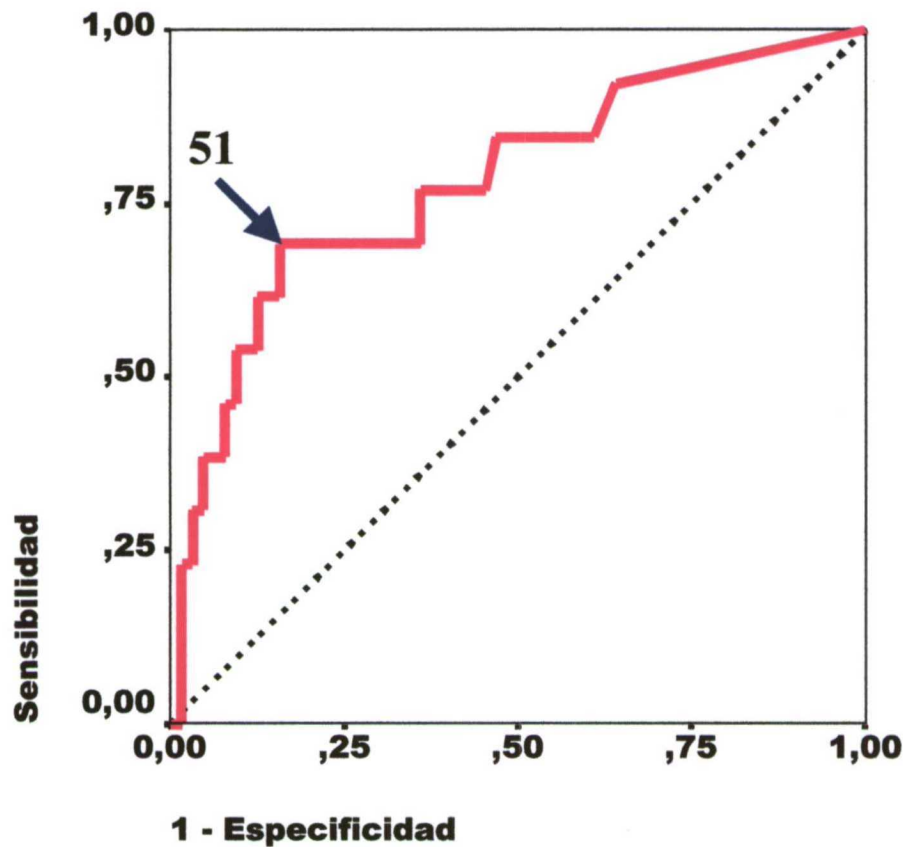


Figura 24.

Probabilidad de detección de IgM-CMV específica y el punto de corte óptimo correspondiente a la carga viral.

El área bajo la curva para detección de IgM fue de 0,78 (I.C. al 95% entre 0,63-0,93), $p = 0,001$. El punto de corte óptimo de 51 copias / ug de ADN total corresponde al punto discriminatorio de máxima sensibilidad y especificidad.

V. Comparación de la PCR cuantitativa con la sospecha clínica

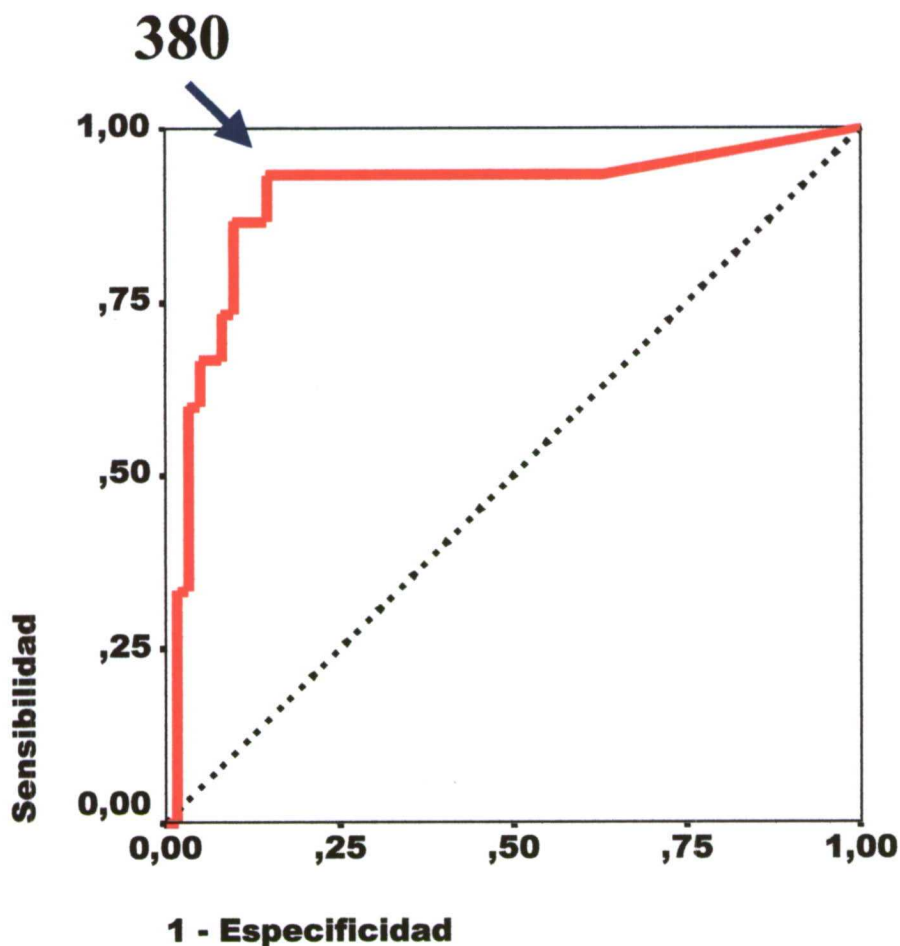


Figura 25.

Probabilidad de detección de CMV por la sospecha clínica y el punto de corte óptimo correspondiente a la carga viral.

El área bajo la curva para la sospecha clínica que representa la capacidad de la PCR cuantitativa para discriminar sanos y enfermos fue de 0,90 (I.C. al 95% entre 0,79-1,00), $p < 0,0001$. El punto de corte óptimo de 380 copias / μg de ADN total que corresponde al punto discriminatorio de máxima sensibilidad y especificidad.

DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

A medida de que el trasplante renal fue imponiéndose como tratamiento de la insuficiencia renal crónica terminal, la población que presenta inmunodepresión ha aumentado como consecuencia de la propia enfermedad, terapia inmunosupresora y de la misma intervención del trasplante, dando lugar a la aparición de cuadros infecciosos severos por virus herpes⁴⁴, sobre todo por CMV^{45,46}, que pueden poner en peligro la supervivencia del injerto, así como la vida del enfermo.

Por ello, se ha intentado conseguir tratamientos nuevos que alcanzarían la misma eficacia con una menor inmunosupresión y en buscar técnicas de diagnóstico de mayor sensibilidad, para detectar estos cuadros infecciosos de una forma temprana y por consiguiente, permitir la instauración del tratamiento antiviral eficaz.

Los métodos de diagnóstico clásicos, serología, aislamiento e identificación por cultivo están bien establecidos para HSV-1, HSV-2, VZV y CMV. No así para VEB, HVH-6, HVH-7 y HVH-8, el primero porque no se cultiva en las líneas celulares clásicas utilizadas rutinariamente en los laboratorios de diagnóstico. En cuanto a HVH-6, HVH-7 y HVH-8, quizás por ser de reciente descubrimiento, las técnicas de diagnóstico rutinario no están todavía implantadas en la mayoría de los laboratorios. Por ello, para el estudio de estos virus se ha utilizado una técnica de PCR diseñada por el equipo del laboratorio, que tiene elevada sensibilidad, ya que puede detectar 10 copias de ADN de los tres virus estudiados, máxime al haber utilizado una PCR con doble amplificación (PCR *nested*) y elevada especificidad ya que los iniciadores utilizados corresponden al genoma buscado.

5.A. Prevalencia global de ADN de CMV, VEB y HVH-6 por PCR *nested*

5.A.1. En muestras de sangre total

Las prevalencias obtenidas en el grupo de enfermos para los tres virus estudiados coinciden con los resultados obtenidos en otros estudios sobre CMV⁴⁷⁻⁵⁰, VEB^{51,52} y HVH-6⁵³⁻⁵⁵.

El hecho de que se detecte el ADN de estos virus en sangre de individuos sanos no es de extrañar, ya que estos virus presentan unas seroprevalencias que superan el 90% de la población adulta y los estudios han estimado que de 6 a 8% de donantes de sangre seropositivos tienen IgM-CMV específica en el momento de la donación⁵⁶.

Toro et al. 1996, encontraron una asociación entre la detección de ADN-CMV en leucocitos mediante la PCR y algún factor estresante en individuos seropositivos sanos. La PCR fue positiva en el 53,6% de muestras de leucocitos y concluyeron que todos los individuos sanos seropositivos tenían alguna muestra positiva durante el período de seguimiento⁶⁰. Wagner et al. y Gopal et al. 1990, detectaron el ADN de VEB y HVH-6 en linfocitos en el 54% y 49% respectivamente de individuos sanos seropositivos^{61,62}.

Se ha detectado una diferencia estadísticamente significativa entre las prevalencias del grupo de enfermos con al menos una muestra positiva y del grupo control, $p < 0,001$ para los tres virus, lo que haría pensar desde el punto de vista virológico, en la existencia al menos en parte, de una infección activa con replicación vírica⁶³⁻⁶⁵ en el grupo de enfermos.

Sin embargo, considerando las prevalencias en el total de muestras de sangre, entre ambos grupos no se encontró una diferencia estadísticamente significativa para los tres virus herpes estudiados, $p = 0,2$ para CMV, $p = 0,6$ para VEB y $p = 0,6$ para HVH-6. Por consiguiente, la PCR *nested* detectando el ADN de los tres virus en muestras de sangre total no discriminaría entre la infección latente presente muchas veces en individuos

sanos y la infección activa, de acuerdo con otros autores como Secchiero et al. 1995 y Locatelli et al. 2000.

En este estudio, se ha detectado ADN-CMV en sangre total en 65 (97%) pacientes y solo el 41,8% que corresponden a 28 pacientes han presentado síntomas compatibles con enfermedad por CMV. Por lo tanto, la detección de un resultado positivo no supone la presencia de una infección sintomática, lo cual coincide con otros estudios^{41,68,69}.

El 60-90% de los candidatos a trasplante tienen una infección latente que puede reactivarse después del trasplante y solo el 20-60% de los trasplantados renales desarrollan infección sintomática por CMV⁷⁰. Por lo tanto, la detección de CMV en el postrasplante no implicaría necesariamente la presencia de infección sintomática.

5.A.2. En muestras de suero

Las prevalencias detectadas en el grupo de enfermos, al obtener un resultado positivo a lo largo de todo el período de seguimiento, coinciden con los resultados de otros estudios sobre CMV^{34,71}, VEB⁵¹ y HVH-6⁷².

Brytting et al. 1992, detectaron el ADN-CMV por PCR *nested* en suero de enfermos trasplantados renales y en 1 donante de sangre seropositivo pero en ningún seronegativo⁵⁶. Stevens et al. 2001, detectaron el ADN-VEB de uno de los 18 donantes de sangre seropositivos por la PCR cualitativa tanto en sangre como en suero⁷³. Coincidiendo con Huang et al. 1992 y Seccheiro et al 1994, no se ha detectado el ADN de HVH-6 en suero por la PCR *nested* en ningún individuo sano que sirvió como control^{74,35}.

El hecho de no detectar el ADN-HVH-6 en individuos sanos, en contraste con otros estudios⁷², puede ser debido a la diferencia en la sensibilidad de detección entre las técnicas de PCR. Oslowy et al. utilizando PCR-ELISA alcanzaron una sensibilidad de detección 30-50 veces mayor que la detección por métodos ordinarios al detectar hasta 3

copias lo que explica que obtuvieran el 21% de positividades en donantes de sangre aparentemente sanos.

Se ha encontrado una diferencia estadísticamente significativa entre las prevalencias de ADN tanto en el número de enfermos como en el total de muestras, y donantes de sangre sanos para los tres virus, $p < 0,001$, lo que nos hace pensar en la posibilidad de una infección activa en el grupo de enfermos.

Al comparar los resultados obtenidos en sangre y suero, tanto para el grupo de enfermos como para el grupo control, se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las prevalencias de los tres virus en sangre y suero, $p < 0,001$. Estos datos sugieren que la PCR *nested* en suero podría ser indicativa de una infección activa puesto que estos virus se quedan latentes en las células linfopolimorfonucleares, hecho importante para el clínico, pues el enfermo con una PCR positiva podría perder el injerto, independientemente de que presente síntomas clínicos. Así Gerna et al. 1994, describieron que la mayoría de las reinfecciones o reactivaciones por CMV que se producen después del trasplante, lo hacen de una forma asintomática⁷⁵.

En este estudio se ha detectado el ADN-CMV por PCR *nested* en suero en los 28 (74,6%) enfermos con sintomatología clínica, sin embargo, 22 (41,8%) no desarrollaron enfermedad.

Para Wolf et al. 1993 y Zipeto et al. 1995 que detectaron ADN en suero y plasma de enfermos inmunodeprimidos, la presencia del ADN reflejaría una mayor replicación vírica en células sanguíneas^{77,78}. En este estudio y en otros se encontró una correlación entre la detección de genoma viral y la presencia de síntomas compatibles con enfermedad^{39,56,79}.

5.B. Influencia del sexo y la edad en las prevalencias de ADN de los virus estudiados

Tanto en el grupo de enfermos como en el grupo control las prevalencias de detección de ADN de los tres virus, en las muestras de sangre como en las muestras de suero, no se ven influenciadas por el sexo, $p > 0,05$.

En el grupo de enfermos como en el grupo control, las prevalencias de detección de ADN de los tres virus entre sangre y suero, no se ve influenciada por la edad, ya que no se encontró una diferencia estadísticamente significativa, $p > 0,05$ para los dos grupos de edad establecidos. Tampoco se han encontrado diferencias en la distribución de prevalencias entre el grupo de enfermos y el grupo control cuando se comparan los resultados en sangre o en suero, $p > 0,05$. Por lo tanto, las diferencias entre las prevalencias de ADN se mantienen en los dos grupos y no están asociadas a la edad.

Por consiguiente, las prevalencias de infección por los tres virus estudiados no se ven influenciadas por el sexo y la edad y tendría que ver con un factor que afecte por igual a hombres y mujeres como podría ser el proceso de inmunodepresión al cual están sometidos todos estos pacientes.

5.C. Prevalencias de las coinfecciones encontradas

Se han estudiado las asociaciones entre los 3 virus en el total de muestras positivas de los dos grupos, enfermos y donantes de sangre sanos, con el fin de establecer:

1. Si existe alguna asociación viral en este tipo de pacientes, para estudiar la tendencia de estos virus herpes a aparecer en presencia de otro en la misma muestra.
2. Para determinar, mediante el seguimiento de las muestras de un mismo paciente, si la reactivación de uno de los virus estudiados estaría condicionada por la reactivación de otro.

Se ha detectado diferencias estadísticamente significativas entre las prevalencias de sangre y suero, $p < 0,001$ tanto para uno, dos o tres virus en el grupo de enfermos.

Para cada uno de los virus estudiados, la distribución de prevalencias de ADN fue significativamente más elevada en suero que en sangre (tabla 8) siendo la diferencia de 1,4 para CMV, 2,9 para VEB y 4,7 para HVH-6. Esto podría sugerir que la reactivación viral en suero se produce por solo un virus.

En sangre, las prevalencias de coinfección por dos y tres virus fueron más elevadas que en suero para los tres virus estudiados en el grupo de enfermos.

En suero, las prevalencias de coinfección por 3 virus fueron 3 veces más baja para CMV, 3,3 para VEB y 3,8 para HVH-6. Las prevalencias de coinfección por 2 virus fueron menores para CMV y VEB y casi se ha mantenido para HVH-6. Esto sugiere que HVH-6 presenta una probabilidad más alta para la coinfección por otro virus (tabla 8).

Al comparar las prevalencias en sangre de enfermos y sanos, no detectamos diferencias estadísticamente significativas en la distribución de las prevalencias para CMV y VEB. Sin embargo, hubo una diferencia estadísticamente significativa en la distribución de las prevalencias de todas las modalidades de coinfección entre los pacientes y el grupo control para HVH-6, $p < 0,001$. Estos datos sugieren que en las muestras de sangre al igual que en las muestras de suero del grupo de enfermos, el HVH-6 se detecta más en compañía de otros virus habiendo una proporción más alta de coinfección por dos virus. Esto haría pensar que HVH-6 presenta una tendencia más elevada para la coinfección con un virus más que los otros virus (tabla 8).

Del análisis de las prevalencias de coinfección por 2 virus entre sangre y suero, se detecta una diferencia clínicamente relevante para las coinfecciones de CMV-HVH-6 y VEB-HVH-6 pero sin obtener una diferencia estadísticamente significativa. Este hecho

puede ser debido quizá a que el intervalo de tiempo de la recogida de muestras fue largo, al haber sido mensual a partir del primer mes postrasplante.

Mediante el seguimiento de muestras de cada paciente, la coinfección por HVH-6 y un virus más en suero, se ha presentado en 21 muestras (36,8%), de las cuales, en el 78% se acompaña con CMV. La infección por HHV6 antecede a la de CMV en el 76,2% de las muestras. En el 22% el HVH-6 se acompaña con VEB pero los resultados no fueron concluyentes en cuanto al virus que se presenta primero ya que se da en el 50% en cada caso.

La coinfección por CMV y un virus más se presenta en el 33,3% en suero acompañándose de una forma similar con VEB (47%) y con HVH-6 (53%). En cuanto al virus que se presenta primero, los resultados tampoco son concluyentes ya que obtuvimos el 52,6% para CMV y el 47,4% para VEB.

5.D. Prevalencias de coinfección sintomática

Debido a que la infección por los tres virus herpes puede dar síntomas similares, hemos estudiado la asociación entre la enfermedad por CMV y los otros 2 virus.

Como reflejan los datos de la tabla 8, ADN-CMV fue detectado en todos los pacientes que han presentado una clínica compatible por este virus. En este grupo de enfermos, se ha detectado HVH-6 en el suero de 24 (85,7%) y VEB en 20 (71,4%). En los 28 pacientes que desarrollaron la enfermedad por CMV, se ha detectado el ADN en suero de HVH-6, VEB o ambos a lo largo del período de seguimiento de los enfermos. Como ya hemos visto, la detección de HVH-6 precede a la de CMV en el 76,2% de las muestras de los pacientes que presentaron coinfección activa por ambos virus, se podría pensar que la reactivación de HVH-6 anteceda a la de CMV dando lugar a la aparición de síntomas en los casos de enfermedad. Posiblemente la reactivación de CMV-HVH-6 podría dar

lugar a la de VEB. Sin embargo, teniendo en cuenta que la reactivación de CMV se ha detectado en el suero de los 28 pacientes que presentaron la enfermedad, superando la presencia de los otros dos virus al presentarse en el 85,7% y 71,4%, un mecanismo alternativo sería que la reactivación por CMV anteceda a la de los otros dos virus, dando lugar a un estado que permita una vigilancia inmune menos efectiva contra HVH-6⁸².

Del análisis de las prevalencias de ADN de los 3 virus herpes estudiados obtenidas por PCR *nested* y teniendo en cuenta que la mayoría de los pacientes trasplantados renales fueron seropositivos para CMV, se podría deducir mediante las asociaciones obtenidas que en este grupo de enfermos habría algún tipo de interacción entre estos virus que implicaría la inducción y desarrollo de la enfermedad por CMV.

Varios estudios clínicos han sugerido la interacción entre HVH-6 y CMV después del trasplante. Herbein et al. 1996, publicaron que los síntomas clínicos severos que se atribuyen a infección por CMV ocurren en trasplantados de órganos sólidos con infección por HVH-6 sólo si tenían una coinfección por CMV⁸⁵. Dockrell et al. 1997, han mostrado que la seroconversión para HVH-6 era un marcador para la enfermedad por CMV después del trasplante hepático independientemente de otros factores de riesgo para la infección sintomática por CMV⁴⁹. DesJardin et al. 1998, utilizando la serología y la PCR cuantitativa sugieren que la reactivación de HVH-6 en el trasplante renal en enfermos con riesgo para desarrollar infección primaria por CMV se asocia con infección y enfermedad por CMV⁸⁶. Según Mendez et al. 2001, la asociación entre la enfermedad por CMV y los 3 β -herpesvirus ocurrió sobre todo en los receptores seronegativos de donantes seropositivos y fue más significativa por la cuantificación viral que por la PCR cualitativa en trasplantados de órganos sólidos⁸².

5.E. Hibridación

Como se ha visto que la PCR *nested* en sangre y suero presenta una sensibilidad alta para la detección de la infección por los tres virus estudiados, se ha utilizado la hibridación con sonda específica para cada uno de los virus estudiados para examinar la especificidad.

De los resultados de la hibridación, se ha detectado un porcentaje de falsos positivos que oscila entre 0 y el 5,3% que podría ser como consecuencia de muchas variables inherentes a la técnica de la PCR *nested*. Creemos que la PCR *nested* ha mostrado superar los falsos positivos causados por contaminación con fragmentos de ADN utilizando las normas básicas de estandarización como el uso de controles adecuados etc. Cabría destacar las posibles amplificaciones inespecíficas que pueden ser debidas al retraso en el procesamiento de las muestras en algunas ocasiones, ya que la preparación tardía de muestras de suero lleva un cierto riesgo de resultados falsos positivos de la PCR, probablemente debido a una lisis leucocitaria^{75,78,90}.

El uso de controles negativos en cada amplificación evitó los resultados falsos negativos que podrían derivarse de la inhibición de la PCR *nested*. Además, el uso de un par de iniciadores más en la PCR *nested* contribuye a obviar dichos resultados al aumentar la sensibilidad.

5.F. Comparación de prevalencias y concordancia de resultados entre la PCR *nested* en suero y otras técnicas de diagnóstico realizadas

5.F.1. Con la serología de CMV y VEB

Cuando consideramos el total de enfermos estudiados, (tablas 11 y 12) las prevalencias de CMV obtenidas por la PCR *nested* en sangre y por la detección del anticuerpo IgG específico fueron similares. Sin embargo, en el total de muestras se

encontró una diferencia estadísticamente significativa entre las prevalencias detectadas por ambas técnicas, $p < 0,001$. A pesar de que ambas técnicas detectan la existencia de infección latente, la discrepancia está en que cuando la IgG específica se hace positiva es para siempre, lo cual no ha sucedido con la PCR en ninguno de los individuos o muestras de nuestro estudio.

En el caso de VEB, hubo una diferencia estadísticamente significativa tanto al considerar los enfermos como al considerar el número total de muestras, entre las prevalencias obtenidas por PCR *nested* en sangre y la detección de IgG específica, $p < 0,001$. Se observa una mayor positividad por PCR *nested* en sangre que por serología. Katz et al. 1989. constataron que era difícil interpretar la serología para VEB en presencia de inmunosupresión⁹⁰ y Telenti et al. 1990. consideraron que la técnica de PCR, por su alta sensibilidad, era la adecuada para el diagnóstico de la infección por VEB⁹⁴.

Tanto en pacientes como en muestras y para ambos virus, se ha obtenido mayores porcentajes de positividad por la PCR *nested* en suero que la detección de IgM para la detección de infección activa, hallándose una diferencia estadísticamente significativa entre las prevalencias detectadas por ambas técnicas, $p < 0,001$. La discordancia con un resultado positivo por PCR e IgM específica negativa podría ser debida a que en pacientes inmunodeprimidos la IgM solo aparece en el 50% de reactivaciones o reinfecciones⁶³ y los signos serológicos de infección se detectan más tarde que la PCR *nested*⁴¹.

5.F.2. Con las técnicas utilizadas para el diagnóstico de la infección activa por CMV

La diferencia entre los porcentajes de positividad (tabla 13) hallados por la PCR *nested* en suero y la detección de infección por el resto de las técnicas de diagnóstico fue estadísticamente significativa tanto en pacientes como en muestras ($p < 0,001$), coincidiendo con otros estudios^{34,56,63}. La PCR *nested* en suero fue la técnica más sensible

detectando el 17,7% más que el cultivo, 16,4% más que la IgM específica y 13,4% más que la Antigenemia.

La discordancia entre PCR *nested* en suero positiva y cultivo negativo, que se refleja en la tabla 14, puede atribuirse al tratamiento con ganciclovir al cual están sometidos 41 (61,2%) de los pacientes. Gerna et al. y Erice et al. encontraron que la mayor parte de las muestras que fueron negativas por *shell vial* procedían de pacientes que estaban siendo tratados con ganciclovir^{68,95}. Esta discrepancia entre los resultados se debe probablemente a la capacidad del ganciclovir para inducir el bloqueo de la replicación del ADN viral en los linfocitos con la inhibición de la infección de los fibroblastos en el cultivo, por lo que algunos autores recomiendan la no utilización de este método para la monitorización de las infecciones activas por CMV en aquellos pacientes tratados con ganciclovir⁹⁶.

La detección de IgM específica es una técnica utilizada rutinariamente para la detección de infección activa por CMV, pero como hemos visto, su utilidad en el manejo de la enfermedad por CMV es limitada, ya que la presencia de ésta puede tardar en aparecer o no hacerlo en pacientes inmunodeprimidos^{41,72}.

Coincidiendo con otros estudios^{97,98}, las dos técnicas que han demostrado más concordancia (85,5%) para la detección de infección activa por CMV fueron la PCR *nested* en suero y la Antigenemia, $K = 0,47$. La PCR en suero presenta 13,4% más de resultados positivos que la Antigenemia. La presencia de Antigenemia positiva y PCR *nested* en suero negativa puede ser debido a que el virus estaba latente en leucocitos en el momento de la extracción. Marenzi et al. 1996, obtienen resultados similares (83%) por ambas técnicas en enfermos de SIDA.

Aunque ambas pruebas parecen asociarse con infección activa por CMV, probablemente expresan hechos biológicos diferentes. Mientras la Antigenemia detecta la

presencia del antígeno en leucocitos, la PCR detecta ADN libre como consecuencia de replicación viral activa^{34,79}.

5.G. Índices de validez de criterios y análisis de las pruebas de diagnóstico para la detección de CMV

En el presente estudio, hemos considerado dos técnicas de referencia. El cultivo (tablas 17 y 18) al igual que el resto de los autores y la PCR *nested* en suero (tablas 19 y 20) porque fue la técnica que presentó mayores índices de positividad se podría deducir que:

Debido a que el cultivo de *shell vial* en muestras de sangre presenta una sensibilidad muy baja (20,8%. I.C. al 95%: 14,2-29,4) en comparación con la PCR *nested* en suero, no parece ser un método adecuado para la detección de infección activa ya que gran proporción de ésta pasaría inadvertida.

La detección de IgM no es una técnica fiable para el diagnóstico de infección activa por CMV porque presenta valores de sensibilidad y VPP bajos en comparación con el cultivo y la PCR *nested* en suero. Por ello, los resultados de esta técnica no son útiles para la detección y la monitorización de la infección activa por CMV en los trasplantados renales coincidiendo con otros estudios^{75,78,101}.

La Antigenemia presenta buena sensibilidad en relación con el cultivo, si bien esta sensibilidad es baja cuando se compara con la PCR *nested* en suero (39,2% con I.C al 95%: 30,5-48,5%). Además, tiene un buen VPP en relación con la PCR *nested* en suero (87% con I.C. al 95%: 74,5-94,2%). Por ello, y por ser una técnica fácilmente reproducible y económicamente rentable, es una técnica fiable para la monitorización de los trasplantados renales, sobre todo si se tiene en cuenta que los resultados pueden ser cuantificados.

Hemos encontrado que la PCR *nested* en suero presenta una sensibilidad óptima en relación con el cultivo (100% con I.C. al 95%: 83,4-99,6%) y presenta un VPP y especificidad similares a los de la Antigenemia cuando se comparan ambas técnicas con el cultivo, además de ser la prueba que ha presentado mayores índices de positividad. Por consiguiente, sería la técnica más adecuada para la detección de la infección activa.

La PCR *nested* en sangre presenta tanto en relación con el cultivo y la PCR *nested* en suero una sensibilidad óptima, una especificidad y un VPP bajos, seguramente debido a que detecta preferentemente infección latente. Por su extrema sensibilidad sería de utilidad en el postrasplante, en un receptor seronegativo de un donante seropositivo, ya que cualquier resultado positivo en este caso sería considerado para instaurar el tratamiento antiviral.

Al presentar todas las técnicas para la detección de infección activa, el cultivo, la detección de IgM específica, la Antigenemia y la PCR *nested* en suero unos valores altos de especificidad y VPN, una función importante de estas técnicas sería la de descartar la infección activa, coincidiendo con otros estudios¹⁰¹.

Los resultados coinciden con otros estudios en que las técnicas no basadas en la PCR no fueron suficientemente sensibles pero tenían generalmente altas especificidades¹⁰¹⁻¹⁰⁴.

5.H. Correlación entre las pruebas de diagnóstico y la sospecha clínica de enfermedad por CMV

Teniendo en cuenta la definición de la enfermedad por CMV dada en el apartado 3.I.de material y métodos, 28 de los enfermos presentaron sospecha clínica compatible con enfermedad por CMV; en la tabla 15 se observa que:

La PCR *nested* en suero fue la técnica más sensible detectando el 100% de estos pacientes y un VPP de 56% coincidiendo con otros estudios^{68,69,71,106}. Esta técnica también ha detectado el ADN-CMV en el 11,6% de muestras que corresponden a 22 pacientes que no presentaron síntomas. En el total de muestras, entre la PCR *nested* en suero y la sospecha clínica por CMV hubo una concordancia en el 83% de muestras ($K = 0,46$). En las muestras (5,4%) que coinciden con una sospecha clínica y en las que no se detecta el ADN-CMV podría corresponder a niveles bajos de ADN viral⁶⁸ debido a la profilaxis antiviral o que los síntomas no corresponderían al agente viral buscado. Por todo ello, la PCR *nested* en suero podría ser considerada la más adecuada para el cribaje de la enfermedad por CMV ya que presenta sensibilidad óptima.

El cultivo fue positivo en 13 de estos pacientes (46,4%) y en 7 pacientes más que no presentaron síntomas. Entre el cultivo y la sospecha clínica, hubo una concordancia del 84,7% dejando sin detectar el 13,4% de muestras en presencia de síntomas.

La IgM específica se detectó en 19 pacientes (67,8)% y en 5 pacientes con ausencia de síntomas. Si se tiene en cuenta que solo un enfermo de los 4 seronegativos que recibieron trasplante seropositivo presentó la enfermedad, la detección de IgM específica en los 18 enfermos restantes que presentaron la enfermedad y en los 5 que no la presentaron sería una indicación de reinfección. Entre la IgM específica y la sospecha clínica, hubo concordancia fue del 89,9% ($K = 0,60$) pero negativa en el 6,7% de las muestras en presencia de síntomas.

La Antigenemia fue positiva en 20 pacientes (71,4%) y en otros 13 pacientes que no presentaron síntomas. Entre la Antigenemia y la clínica hubo una concordancia del 85,3% ($K = 0,36$) dejando sin detectar el 10,4 % de las muestras en presencia de síntomas. Por consiguiente, es frecuente que las pruebas de diagnóstico sean positivas en las reinfecciones o la reactivaciones asintomáticas en los trasplantados renales seropositivos de acuerdo con otros estudios^{41,107}.

En presencia de enfermedad por CMV, la PCR *nested* en suero ha sido siempre positiva cuando lo era la Antigenemia, la detección de IgM específica y el *shell-vial*.

5.I. Enfermos seronegativos para CMV en el pretrasplante y su evolución

En el período del pretrasplante es fundamental conocer la serología ya que la ausencia de anticuerpos específicos indica susceptibilidad de los candidatos a trasplante renal para desarrollar una infección primaria.

De los 7 pacientes que fueron seronegativos antes del trasplante, 3 recibieron su riñón de donante seronegativo y 4 lo recibieron de donante seropositivo. De los 3 receptores seronegativos que contaron con donante igualmente seronegativo, solo uno presentó un resultado positivo, que fue por la técnica de PCR *nested* en sangre pero ninguno desarrolló la enfermedad coincidiendo con otros estudios⁷².

Si bien algunos autores como Tong et al. 1998. en un estudio para predecir la enfermedad por CMV en trasplantados renales no incluyeron por motivos éticos a los pacientes seronegativos que habían recibido su injerto de donantes seronegativos, ya que la infección y la enfermedad por CMV es una rareza en estos pacientes¹⁰¹, el hecho de detectarse un resultado positivo por PCR *nested* en sangre de estos pacientes tampoco es algo extraño ya que Larsson et al. habían demostrado que el ADN-CMV se podía detectar

en leucocitos de sangre periférica de todos los enfermos seropositivos y de la mayoría de los donantes de sangre seronegativos investigados con el tiempo⁴⁷.

La incidencia de infección activa en los receptores seronegativos con donante seropositivo fue del 75% (en 3 de los 4 se detectó el ADN-CMV por PCR *nested* en suero) y en el 50% cuando se consideran positivas al menos 2 pruebas.

Parece que estos resultados apoyan la idea, de que el injerto trasplantado es la principal fuente de virus en receptores seronegativos, tal y como ya ha sido sugerido previamente^{113,116}.

Los 4 pacientes seronegativos que recibieron un riñón de un donante seropositivo han presentado una infección por CMV detectada por al menos una técnica, y solo uno de éstos que han adquirido la infección por CMV ha desarrollado la enfermedad discrepando con otros estudios en que todos los pacientes en los que se ha detectado el ADN-CMV desarrollaron la enfermedad¹⁰¹. Quizá esto sea debido al tratamiento profiláctico al cual estaban sometidos estos pacientes a diferencia del estudio mencionado en el que solo uno de 37 trasplantados renales había tomado un tratamiento con aciclovir en el período del pretrasplante.

Por todo ello, en estos pacientes con un riesgo alto para desarrollar una infección primaria por CMV, el resultado positivo de cualquier prueba sería significativo y estaría indicado el tratamiento antiviral específico. La técnica de elección en este grupo de pacientes sería la PCR *nested* en sangre o suero ya que fue la técnica más sensible para la detección de CMV.

5.J. PCR cuantitativa en tiempo real en el diagnóstico de infección y enfermedad por CMV

Los avances tecnológicos han hecho posible la utilización de técnicas sensibles y específicas para que una reacción se haga positiva antes del comienzo de la enfermedad indicando que hay que instaurar el tratamiento adecuado. En este estudio, vemos que la detección de ADN-CMV por técnicas de PCR cualitativas: 1) no indica siempre una enfermedad por CMV al no acompañarse siempre de síntomas, 2) puede persistir meses a pesar de un tratamiento antiviral efectivo limitando el uso clínico de la PCR cualitativa para este objetivo coincidiendo con otros estudios^{65,71} y 3) muchos de los pacientes que dieron resultado negativo también desarrollan enfermedad por CMV.

En este sentido, la cuantificación de ADN-CMV podría ser de más valor en la monitorización de la enfermedad por CMV y el tratamiento antiviral correspondiente^{68,107,117} ya que orientaría al clínico en cada momento sobre la carga viral y la necesidad de instauración de tratamiento si supera un determinado número de copias a partir del cual sería muy probable el desarrollo de la enfermedad.

La determinación cuantitativa del ADN en suero parece ser mucho menos sensible que el ADN en leucocitos para monitorizar la infección por CMV y el tratamiento antiviral⁷⁵, por lo que se ha realizado la determinación de la carga vírica en muestras de sangre total.

5.J.1. Correlación de la carga viral con la clínica y el tratamiento

Se ha comparado la carga viral de los enfermos que presentaron una infección sintomática por CMV con aquella de los enfermos que presentaban una infección asintomática, observando que la mediana del número de copias en los sintomáticos (4845 copias / ug de ADN) fue significativamente mayor que en los asintomáticos (18 copias / ug de ADN), ($p < 0,001$), coincidiendo con otros estudios^{43,49}. Dado que el número de

muestras de pacientes que no presentaban la enfermedad fue elevado, se podría deducir que la PCR cuantitativa podía haber sido de gran utilidad para monitorizar la infección activa y así evitar la administración de tratamiento antiviral a los que no lo precisaban.

5.J.2. Comparación de las técnicas de diagnóstico para detectar la infección activa por CMV

Se han utilizado las curvas de rendimiento diagnóstico (ROC) para: 1- analizar la relación entre la cuantificación de la carga viral y la capacidad de cada prueba de diagnóstico para discriminar la presencia de infección activa que se representa mediante el área bajo la curva y 2- seleccionar el punto de corte óptimo que corresponde a la máxima sensibilidad y especificidad para cada prueba diagnóstica.

Como se observa, todas las pruebas de diagnóstico de infección activa presentan un buen área bajo la curva que oscila entre 0,78 para la detección de IgM y 0,90 para la antigenemia encontrando un solapamiento entre los valores del intervalo de confianza, aportando todas las técnicas en este sentido una buena capacidad de discriminación de la presencia de infección activa. Sin embargo, existen diferencias en cuanto al valor del punto de corte discriminatorio de máxima sensibilidad y especificidad, destacando la necesidad del cultivo de 590 copias / μg de ADN para detectar la presencia del virus. La PCR nested en suero y la antigenemia requieren el mismo número de copias para discriminar la presencia de infección activa, 125 y 126 copias / μg de ADN respectivamente por lo que se positivizan más temprano que el cultivo y serían los métodos de elección para decidir la instauración del tratamiento antiviral y la monitorización de la respuesta a dicho tratamiento cuando se carece de la PCR cuantitativa. Si bien la detección de IgM específica en nuestro estudio ha necesitado solo 51 copias / μg de ADN para hacerse positiva, el que no se haya detectado ésta podría deberse a la terapia inmunosupresora.

5.J.3. PCR cuantitativa en el diagnóstico de la enfermedad por CMV

La PCR cuantitativa ha presentado buena capacidad de discriminación entre enfermos y sanos ya que el área bajo la curva fue de 0,90 (I.C. al 95% entre 0,79-1,00) $p < 0,0001$. El punto de corte óptimo de 380 copias de ADN-CMV corresponde a la capacidad de la PCR cuantitativa para discriminar enfermos y sanos. A pesar de que una gran proporción de muestras fue de pacientes que recibían ganciclovir, el punto de corte de 380 copias de ADN-CMV presentó una sensibilidad de 93,3% (I.C. al 95%: 66,0 – 99,6%), especificidad del 85,5% (I.C. al 95%: 73,7–92,7%), VPP de 60,9% (I.C. al 95%: 38,8-79,5%) y VPN de 98,1% (I.C. al 95%:88,8-99,9%). El hallazgo de que el 60,9% de los pacientes con ADN-CMV detectable desarrollaron enfermedad es un dato a favor del uso de la PCR cuantitativa como una técnica de diagnóstico para monitorizar el momento de iniciar la "terapia guiada" de acuerdo con otros autores⁹⁸, teniendo en cuenta que los valores de la carga viral habrían sido más altos si los pacientes no hubieran sido tratados con ganciclovir⁴².

Si bien la PCR cuantitativa ha mostrado ser una técnica adecuada para la detección de la enfermedad por CMV, por su elevado coste y complejidad no está al alcance de la mayoría de los laboratorios. En los trasplantados renales, la Antigenemia por su simplicidad, bajo coste y su especificidad ha sido una buena herramienta de diagnóstico para predecir la infección activa por CMV en comparación con los métodos moleculares cualitativas (Van den Berg et al 1992, Halwachs et al 1993 y Murray et al 1997) y de acuerdo con los resultados del presente estudio se podría utilizar para la monitorización de la infección activa una vez detectada ésta por una técnica sensible como la PCR *nested* en suero, por lo que se puede considerar como una alternativa cuando no se dispone de la PCR cuantitativa.

CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

A la vista de los resultados obtenidos, las conclusiones que podemos extraer del presente estudio son las siguientes:

- 1.- Las prevalencias en sangre y suero, de ADN de CMV, VEB y HHV-6 en enfermos trasplantados renales, cuando al menos una muestra es positiva, son significativamente más elevadas que las prevalencias de ADN de los mismos virus en el grupo control ($p < 0,001$), lo que hace pensar que durante el proceso del trasplante renal disminuye la vigilancia inmune frente a estos virus.
- 2.- En el total de muestras de suero, se han detectado diferencias estadísticamente significativas entre las prevalencias de ADN de los 3 virus, a diferencia de las muestras de sangre en que las prevalencias de ambos grupos fueron similares.
- 3.- Se han encontrado diferencias estadísticamente significativas entre las prevalencias de estos virus en sangre y suero tanto en enfermos como en el grupo control. Lo que hace pensar que la PCR *nested* en suero podría ser un marcador de infección activa.
- 4.- Ni la edad ni el sexo han influenciado en las prevalencias de ADN obtenidos.

- 5.- De los 3 virus herpes, HHV-6 es el que presenta una tendencia más elevada para la coinfección activa con un virus más. La asociación con CMV (78%) fue más frecuente que con VEB (22%).
- 6.- La infección activa por HHV6 precede a la de CMV en el 76,2% de las muestras.
- 7.- En la infección sintomática por CMV se ha detectado el ADN en suero de HHV-6, VEB o ambos a lo largo del período de seguimiento de los enfermos. Lo que hace pensar que habría algún tipo de interacción entre estos virus que implicaría la inducción y desarrollo de la enfermedad por CMV.
- 8.- Hemos encontrado una diferencia estadísticamente significativa entre las prevalencias detectadas por PCR *nested* e IgM específica para CMV y VEB.
- 9.- La prevalencia de infección activa en los receptores seronegativos con donante seropositivo fue del 75%. La técnica de elección en este grupo de pacientes sería la PCR *nested* en sangre o suero ya que fue la técnica más sensible para la detección de CMV.
- 10.- Para el diagnóstico de infección activa por CMV, la PCR *nested* en suero fue la técnica más sensible detectando el 17,7%, 16,4% y 13,4% más positividades que el cultivo de *shell vial*, detección de IgM específica y la Antigenemia respectivamente.
- 11.- El cultivo de *shell vial* fue la técnica menos sensible en comparación con la PCR *nested* en suero.

- 12.- La PCR *nested* en suero y la Antigenemia han sido las técnicas que han mostrado más concordancia (85,5%) para la detección de infección activa por CMV.
- 13.- La Antigenemia tiene una sensibilidad baja cuando se compara con la PCR *nested* en suero y buen valor predictivo positivo en relación con el cultivo.
- 14.- Se confirma que las técnicas para la detección de infección activa, el cultivo, la detección de IgM específica, la Antigenemia y la PCR *nested* en suero presentan unos valores altos de especificidad y valor predictivo negativo.
- 15.- Para la detección de enfermedad por CMV, la PCR *nested* en suero ha sido la técnica más sensible detectándose en el 100% de los enfermos y el cultivo la técnica que presentó menor sensibilidad (46,4%).
- 16.- La mediana de la carga viral medida por la PCR cuantitativa en sangre fue significativamente más elevada en los pacientes con infección sintomática que en los asintomáticos.
- 17.- El valor del punto de corte discriminatorio de máxima sensibilidad y especificidad para la PCR *nested* en suero y la Antigenemia fue similar para discriminar la presencia de infección activa.
- 18.- La PCR cuantitativa presenta una buena capacidad de discriminación entre enfermos y sanos para el punto de corte óptimo de 380 copias de ADN-CMV.

BIBLIOGRAFÍA

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Pahissa A. *Introducción*. Enfer Infecc Microbiol Clín 1997; 15 (Supl 2): 1-2.
2. Pasado AJ, *Presente y futuro de los trasplantes renales*. En: Caralps A, Gil-Vernet J, Vives J, et al. eds. *Trasplante Renal*. Barcelona: Toray, 1983; 3-8.
3. Organización Nacional de Trasplantes (ONT), Ministerio de Sanidad y Consumo. <http://www.msc.es/ont/esp/estadisticas/rinon/renales.htm>
4. Hernández Pérez J, Fernández Fernández J, y Sanz Moreno C. *Trasplante renal*. Rev Clin Esp 1994; 194, monográfico 1:226-234.
5. Chan L, *Outcome and complications of renal transplantation*. En: Schrier RW, Gottschalk CW, eds. *Diseases of the kidney*. 5ª ed. Little, Brown and company, 1993; 2911-2967.
6. Cisneros JM, Cañas E, y Pachón J. *Evaluación pretrasplante del donante y del receptor. Recomendaciones para la vigilancia y control de la infección después del trasplante*. Enfer Infecc Microbiol Clín 1997;15 (Supl 2): 98-103.
7. Cotorruelo J. *El donante subóptimo*. Nefrología 1991; XI (5): 377-379.
8. Helderman JH, and Goral S. *Transplantation immunobiology*. En: Danovitch GM, *Handbook of kidney transplantation*. 2ª ed. Little, Brown and Company, 1996; 14-31.
9. Roitt I, Brostoff J, Male D. *Inmunología*. 2ª ed. Salvat eds. 1991. 20.8. 24.1-24.10.
10. Rodríguez Ferrero M, y Valderrábano F. *Inmunosupresión en el trasplante renal. Viejos fármacos y nuevas adquisiciones*. Rev Clin Esp 1997; 197: 703-712.

11. Morris PJ, Chan L, French ME, Ting A. *Low-dose oral prednisolone in renal transplantation*. Lancet 1982; 1 525.
12. Lu CY, Sicher SC, Vázquez MA. *Prevention and treatment of renal allograft rejection: new therapeutic approaches and new insights into established therapies*. J Am Soc Nephrol 1993; 4: 1239-1256.
13. Portela D, Patel R, Larson-Keller JJ et al. *OKT3 treatment for allograft rejection is a risk factor for cytomegalovirus disease in liver transplantation*. J Infect Dis 1995; 171: 1014-1018.
14. Gavaldá J, y Pahissa A. *Factores de riesgo y cronología de la infección en el trasplante de órgano sólido*. Enfer Infecc Microbiol Clín 1997;15 (Supl 2):3-11.
15. Cleator GM, Klapper PE. *The Herpesviridae*. En Zukerman AJ, Banavalta JE y Pattison JR, eds. Principles and practice of clinical virology. 3ª ed. Chichester. John Wiley & Sons. 1994. P:1-152.
16. Braun DK, Domínguez G, Pellet PE, *Human herpesvirus 6*. Clinical Microbiology Reviews 1997; 10: 521-567.
17. Poirel L, Aubin JT, Gautheret A et al. *Use of inverse polymerase chain reaction to characterize a novel human herpesvirus 7 isolate*. J Virol Methods 1997; 64:197-203.
18. Agut H, Dupin N, Huraux JM. *Human herpesvirus 8*. Transfus Clin Biol 1996; 3: 51-56.
19. Frenkel N, Wyatt LS. *HHV-6 and HHV-7 as exogenous agents in human lymphocytes*. Dev Biol Stand 1992; 76: 259-265.

20. Wyatt LS, Rodriguez WJ, Balachandran N, Frenkel N. *Human herpesvirus 7: antigenic properties and prevalence in children and adults*. J Virol 1991; 65: 6260-6265.
21. Smith MS, Bloomer C, Hovart R, et al. *Detection of human herpesvirus 8 DNA in Kaposi's sarcoma lesions and peripheral blood of human immunodeficiency virus-positive patients and correlation with serologic measurements*. J Infect Dis 1997; 176: 84-93.
22. Gessain A, Briere J, Angelin-Duclos C et al. *Human herpesvirus 8 (Kaposi's sarcoma herpes virus) and malignant lymphoproliferations in France: a molecular study of 250 cases including two AIDS-associated body cavity based lymphomas*. Leukemia 1997; 11: 266-272.
23. Gleaves CA, Smith TF, Shuster EA et al. *Rapid detection of CMV in MRC-5 cells inoculated with urine specimens by using low-speed centrifugation and monoclonal antibody to an early antigen*. J Clin Microbiol 1984; 19: 917-919.
24. Drew WL, Miner R, Bush D et al. *Prevalence of resistance in patients receiving ganciclovir for serious CMV infection*. J Infect Dis 1991; 716-719.
25. Plotkin SA, Starr SE, Friedman HM et al. *Effect of townes live virus vaccine on cytomegalovirus disease after renal transplant: a controlled trial*. Ann Intern Med 1991; 114: 525-531.
26. Spector SA, Rua Ja, Spector DH et al. *Detection of human cytomegalovirus in clinical specimens by DNA-DNA hybridization*. J Infect Dis 1984; 150: 121-126.
27. Southern EM. *Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis*. J Mol Biol 1975; 98: 503-517.

28. Mullis KB, Faloona FA. *Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia*. Methods Enzimol 1987; 230: 1350-1354.
29. Ljungman P. *Cytomegalovirus infections in transplant patients*. Scand J Infect Dis 1996;(suppl 100):59-63.
30. Ljungman, P., and S. Plotkin. *Workshop on CMV disease-definitions, clinical severity scores and new syndromes*. Scand.J. Dis. 1995; Suppl.99: 87-89.
31. Crawford DH. *Epstein-Barr virus*. Principles and Practice of Clinical Virology. 1995; 109-133.
32. Ablashi DV, Krueger GRF and Salahuddin SZ. *Human herpesvirus-6. Epidemiology, molecular biology and clinical pathology*. In: Perspectives in medical virology. Vol 4. Elsevier. 1992.
33. Cinque P, Brytting, Vago L et al. *Epstein-Barr virus DNA in cerebrospinal fluid from patients with AIDS-related primary lymphoma of the central nervous system*. Lancet 1993; 342: 398-401.
34. Freymuth F, Gennetay E, Pettitjean J et al. *Comparison of nested PCR for detection of DNA in plasma with pp⁶⁵ leucocytic antigenemia procedure for diagnosis of human cytomegalovirus infection*. J Clin Microbiol 1994; 32:1614-1618.
35. Seccheiro P, Carrigan D.R, Asano Y et al. *Detection of human herpesvirus 6 in plasma of children with primary infection and immunosuppressed patients by polymerase chain reaction*. J Infec Dis 1994; 171:273-280.
36. Shibata D. *PCR-based detection of the herpesviruses and the papilomaviruses*. En Ehrlich GD, Greenberg SJ, eds. PCR-based diagnostics in infectious disease. 1^a ed. Boston. Blackwell scientific publications. 1994. p 455-481.

37. Montero G, Zonaro A, Bertolo P et al. *DNA enzyme immunoassay (DEIA): a general method for detecting PCR products based on anti-DNA antibody*. Clin. Chem 1991; 37:422-429.
38. Gault E, Michel Y, Dehée A et al. *Quantification of human cytomegalovirus DNA by real-time PCR*. J Clin Microbiol 2001; 39:772-775.
39. Boeckh M, and Boivin G. *Quantitation of cytomegalovirus: methodologic aspects and clinical applications*. J Clin Microbiol Rev.1998; 11:533-554.
40. Ljungman P, Plotkin SA. *Workshop on CMV disease; definitions, clinical severity scores, and new syndromes*. Scand J Infect Dis 1995. Suppl 99: 87-89.
41. Weber B, Nestler U, Ernst W et al. *Low correlation of cytomegalovirus DNA amplification by polymerase chain reaction with cytomegalovirus disease in organ transplant recipients*. J Med Virol 1994;43:187-193.
42. Aitken C, Barrett-Muir W, Millar C et al. *Use of molecular assays in diagnosis and monitoring of cytomegalovirus disease following renal transplantation*. J Clin Microbiol 1999;38: 2804-2807.
43. Roberts T C, Brennan D C, Buller R S et al. *Quantitative polymerase chain reaction to predict occurrence of symptomatic cytomegalovirus infection and assess response to ganciclovir therapy in renal transplant recipients*. J Infect Dis 1998;178:626-635.
44. Hökenberg I., Eriksson B M, Zwegberg-Wirgart B Et al. *Diagnostic markers and risk factors of cytomegalovirus infection and disease in renal allograft recipients*. Scand J Infect Dis 1995; 27: 435-440.
45. Bitsch A, Kirchner H, Dennin R et al. *The long persistence of CMV DNA in the blood of renal transplant patients after recovery from CMV infection*. Transplantation 1993;56:108-113.

46. Pérez J. L. Y García A. *Diagnóstico de laboratorio de las infecciones por citomegalovirus*. Rev Clin Esp 1998; 198: 9-10.
47. Larsson S, Soderberg NC, Wang FZ, y Moller E. *Cytomegalovirus DNA can be detected in peripheral blood mononuclear cells from all seropositive and most seronegative healthy blood donors over time*. Transfusion 1998; 38: 271-278.
48. Wilhelm JA, Matter L, and Schopfer K. *The risk of transmitting cytomegalovirus to patients receiving blood transfusions*. J Infect Dis. 1986;154:169-171.
49. Camargo LFA, Uip DE, Simpson AAG et al. *Comparison between Antigenemia and a quantitative competitive polymerase chain reaction for the diagnosis of cytomegalovirus infection after heart transplantation*. Transplantation 2001;71:412-417.
50. Miller MJ, Bovey S, Pado K et al. *Application of PCR to multiple specimen types for diagnosis of cytomegalovirus infection: comparison with cell culture and Shell Vial assay*. 1994;32:5-10.
51. Yamamoto M, Kimura H, Hironaka T et al. *Detection and quantification of virus DNA in plasma of patients with Epstein-Barr virus-associated diseases*. J Clin Microbiol 1995; 33:1765-1768.
52. Jabs WJ, Hennig H, Kittel M et al. *Normalized quantification by real-time PCR of Epstein-Barr virus load in patients at risk for posttransplant lymphoproliferative disorders*. J Clin Microbiol 2001;39:564-569.
53. Dockrell DH, Prada J, Jones MF et al. *Seroconversion to human herpesvirus 6 following liver transplantation is a marker of cytomegalovirus disease*. Transplantation 1997; 176:1135-1140.

54. Cuende JL, Ruiz MP, Civeira MP and Prieto J. *High prevalence of HHV-6 DNA in peripheral blood mononuclear cells of healthy individuals detected by nested-PCR.* J Clin Virol 1994; 43:115-118.
55. Wilborn F, Schmidt R, Zimmerman et al. *Detection of herpesvirus type 6 by polymerase chain reaction in blood donors: random tests and prospective longitudinal studies.* Br J Haematol.1994; 88: 1065-1067.
56. Brytting N, Xu W, Wahren B and Sundqvist V-A. *Cytomegalovirus DNA detection in sera from patients with active cytomegalovirus infections.* J Clin Microbiol 1992; 30:1937-1941.
57. Brytting M, Mousavi-Jazi M, Bostrom I et al. *Cytomegalovirus DNA in peripheral blood leukocytes and plasma from bone marrow transplant recipients.* Transplantation 1995;60:961-965.
58. Wilhelm JA, Matter L, and Schopfer K. *The risk of transmitting cytomegalovirus to patients receiving blood transfusions.* J Infect Dis. 1986;154:169-171.
59. Rabella N, Perez JL y Pumarola T. *El laboratorio de virología en la infección por citomegalovirus. Posibilidades actuales.* Enferm Infecc Microbiol Clin 1997;15 (Supl 2):69-76.
60. Toro A I, Ossa J. *PCR activity of CMV in healthy CMV-seropositive individuals: does latency need redefinition?* Res. Virol. 1996; 147; 233-238.
61. Wagner H J, Bein G, Bitsch A and Kirchner H. *Detection and quantification of latently infected B lymphocytes in Epstein-Barr virus-seropositive, healthy individuals by polymerase chain reaction.* J Clin Microbiol 1992; 30:2826-2829.
62. Gopal MR, Thomson BJ, Fox J, et al. *Detection by PCR of HHV-6 and EBV DNA in blood and oropharynx of healthy adults and HIV-seropositives.* Lancet 1990; 335:1598-1599.

63. Landini MP and Mach M. *Searching for antibodies specific for human cytomegalovirus: Is it diagnostically useful? When and how.* Scand J Infect Dis 1995;suppl:18-23.52.
64. Landini MP. *New Approaches and Perspectives in Cytomegalovirus Diagnosis.* Prog Med Virol. 1993;vol 40, 157-177.ed: Melnick J L.
65. Zipeto D, Revello MG, Silini E et al. *Development and clinical significance of a diagnostic assay based on the polymerase chain reaction for detection of human cytomegalovirus DNA in blood samples from immunocompromised patients.* J Clin Microbiol 1992;30:527-530.
66. Secchiero P, Zella D, Crowley R W et al. *Quantitative PCR for human herpesviruses 6 and 7.* J Clin Microbiol 1995;33: 2124-2130.
67. Locatelli G, Santoro F, Veglia F et al. *Real-time quantitative PCR for human herpesvirus 6 DNA.* J Clin Microbiol 2000;38: 4042-4048.
68. Gerna G, Zipeto D, Parea M et al. *Monitoring of human cytomegalovirus infections and ganciclovir treatment in heart transplants by determination of viremia, Antigenemia and DNAemia.* J Infet Dis 1991;164:488-498.
69. Delgado R, Lumbreras C, Alba C et al. *Low predictive value of polymerase chain reaction for diagnosis of cytomegalovirus disease in liver transplant recipients.* J Clin Microbiol 1992;30:1876-1878.
70. Hibberd PL, Tolckoff-Rubin NE, Cosimi AB, et al. *Symptomatic cytomegalovirus disease in cytomegalovirus antibody seropositive renal transplant recipient treated with OKT3.* Transplantation 1992;53:68-72.
71. Patel R, Smith TF, Espy M et al. *Detection of cytomegalovirus DNA in sera of liver transplant recipients.* J Clin Microbiol 1994;32:1431-1434.

72. Oslowy C, Prud'Homme I, Monnette M and Zou. *Detection of human herpesvirus 6 DNA in serum by a microplate PCR-Hybridization assay.* J Clin Microbiol 1998; 36:68-72.
73. Stevens SJC, Pronk I and Middeldorp JM. *Toward standarization of Epstein-Barr virus DNA load monitoring: unfractionated whole blood as preferred clinical specimen.* J Clin Microbiol 2001;39:1211-1216.
74. Huang LM, Kuo PF, Lee C-Y et al. *Detection of human herpesvirus-6 DNA by polymerase chain reaction in serum or plasma.* J Med Virol. 1992;38:7-10.
75. Gerna G, Furione M, Baldanti F et al. *Comparative quantitation of human cytomegalovirus DNA in blood leukocytes and plasma of transplant and AIDS patients.* J Clin Microbiol 1994; 32:2709-2717.
76. Drouet E, Coliman R, Michelson S et al. *Monitoring levels of human cytomegalovirus DNA in blood after liver transplantation.* J Clin Microbiol 1995;33:389-394.
77. Wolf DG, and Spector SA. *Early diagnosis of human cytomegalovirus disease in transplant recipients by DNA amplification in plasma.* Transplantation 1993;56:330-334.
78. Zipeto D, Morris S, Hong C et al. *Human cytomegalovirus (CMV) DNA in plasma reflects quantity of CMV in leucocytes.* J. Clin. Microbiol. 1995; 33: 2607-2611.
79. Spector SA, Merrill R, Wolf D et al. *Detection of cytomegalovirus in plasma of AIDS patients during acute visceral disease by DNA amplification.* J Clin Microbiol 1992;30:2359-2365.
80. Chen Y-T., Mercer G.O., Cheign J. S. and Mouradian J.A. *Cytomegalovirus infection of renal allografts.* Transplantation.1992;53:99-102.

81. Percivalle E, Revello MG, Vago L, et al. *Circulating endothelial giant cells permissive for human cytomegalovirus (HCMV) are detected in disseminated HCMV infections with organ involvement.* J Clin Invest 1993;92:663-670.
82. Mendez JC, Dockrell DH, Espy MJ et al. *Human β -herpesvirus interactions in solid organ transplant recipients.* J Infect Dis 2001; 183: 179-184.
83. Dockrell DH, Mendez JC, Jones M et al. *Human herpesvirus 6 seronegativity before transplantation predicts the occurrence of fungal infection in liver transplant recipients.* Transplantation 1999; 67:399-403.
84. Hall CB, Long CE, Schnabel KC et al. *Human herpesvirus-6 in children. A prospective study of complications and reactivation.* N Engl J Med 1994; 33: 432-438.
85. Herbein G, Strausswimmer J, Altieri M et al. *Longitudinal study of human herpesvirus 6 infection in organ transplant recipients.* Clin Infect Dis 1996; 22:171-173.
86. DesJarden JA, Gibbons L, Cho E, et al. *Human herpesvirus 6 reactivation is associated with cytomegalovirus infection and syndromes in kidney transplant recipients at risk for primary cytomegalovirus infection.* J Infect Dis 1998; 178: 1783-1786.
87. Suga S, Yazaki T, Kajita Y et al. *Detection of human herpes 6 DNAs in samples from several body sites of patients with exanthema subitum and their mothers by polymerase chain reaction assay.* J Med Virol 1995; 46: 52-55.
88. Schäfer P, Tenschert W, Schröter M et al. *False-positive results of plasma PCR for cytomegalovirus DNA due to delayed sample preparation.* J Clin Microbiol 2000;38:3249-3253.

89. Ehrnst A and Einsele H. *Towards standardizations of CMV DNA PCR assays.* Scand J Infect Dis 1995;Suppl 99:16-18.
90. Katz BZ, Raab-Traub N, and Miller G. *Latent and replicating forms of Epstein-Barr virus DNA in lymphomas and lymphoproliferative disease.* J Infect Dis 1989;160: 589-598.
91. Kanegane H, Wado T, Nunogami K et al. *Chronic persistent Epstein-Barr virus infection of natural killer cells and B cells associated with granular lymphocytes expansion.* Br J Haematol 1996; 95:116-122.
92. Baldanti F, Grossi P, Furione M et al. *High levels of Epstein-Barr virus DNA in blood of solid-organ transplant recipients and their value in predicting posttransplant lymphoproliferative disorders.* J Clin Microbiol 2000; 38:613-619.
93. Crompton CH, Cheung RK, Donjon C et al. *Epstein-Barr virus surveillance after renal transplantation.* Transplantation 1994; 57: 1182-1189.
94. Telenti A, Marshall WF, and Smith TF. *Detection of Epstein-Barr virus by polymerase chain reaction.* J Clin Microbiol 1990; 28:2187-2190.
95. Erice A, Holm MA, Gill PC et al. *Cytomegalovirus (CMV) antigenemia assay is more sensitive than shell vial cultures for rapid detection of CMV in polymorphonuclear blood leukocytes.* J Clin Microbiol 1992; 30:11: 2822-2825.
96. Landry ML, Ferguson D, Stevens-Ayers T et al. *Evaluation of CMV Brite kit for detection of cytomegalovirus pp⁶⁵ antigenemia in peripheral blood leucocytes by immunofluorescence.* J Clin Microbiol 1996;34:1337-1339.
97. Marenzi R., Cinque P., Ceresa D. Et al. *Serum polymerase chain reaction for cytomegalovirus DNA for monitoring ganciclovir treatment in AIDS patients.* Scand J Infect Dis 1996; 28: 347-351.

98. Caliendo AM, ST George K, Kao S et al. *Comparison of quantitative cytomegalovirus (CMV) PCR in plasma and CMV Antigenemia assay: clinical utility of the prototype Amplicor CMV Monitor Test in transplant recipients.* J Clin Microbiol 2000; 38: 2122-2127.
99. Paya CV, Wold AD, Smith TF, et al. *Detection of cytomegalovirus infections in specimens other than urine by the shell vial assay and conventional tube cell cultures.* J Clin Microbiol. 1987;25:755-757.
100. Prieto Reina J, Besrard Palmer X, Saurina Gomila J. et al. *Utilidad del cultivo de orina y sangre para el diagnóstico de infección por citomegalovirus en el receptor de trasplante renal.* Rev Clín Esp 1998; 198:3-6.
101. Tong CY, Cuevas L, Williams H, and Bakran A. *Use of laboratory assays cytomegalovirus disease in renal transplant recipients.* J Clin Microbiol 1998; 36: 2681-2685.
102. Bek B, Boeckh M, Lepenies J et al. *High-level sensitivity of quantitative pp⁶⁵ cytomegalovirus (CMV) Antigenemia assay for diagnosis of CMV disease in AIDS patients and follow-up.* J Clin Microbiol 1996;34:457-459.
103. Sharma AK, Taylor JD, Tong MW et al. *Utility of the pp⁶⁵ direct antigenemia test in the diagnosis of cytomegalovirus (CMV) in renal transplant recipients.* Trans. Proceedings, 1997; 29; 799.
104. Boland GJ, Weger RA, Tilanus MGJ et al. *Detection of cytomegalovirus (CMV) in granulocytes by polymerase chain reaction compared with the CMV antigen test.* J Clin Microbiol 1992;30:1763-1767.
105. Yague V, Cour I, Kanaan A, et al. *Citomegalovirus: estudio comparativo de técnicas de diagnóstico.* Enferm Infecc Microbiol Clin. 1998; 16: 163-168.

106. Abecassis MM., Koffron AJ., Buckingham M et al. *Role of PCR in the diagnosis and management of CMV in solid organ recipients: What is the predictive value for development of disease and should PCR be used to guide antiviral therapy?* Trans. Proceedings, 1997; 29; 800-801.
107. Tanaka N, Kimura H, Iida K et al. *Quantitative analysis of cytomegalovirus load using a real-time PCR assay.* J Med Virol 2000;60:455-462.
108. Nitsche A, Steuer N, Schmidt A et al. *Different real-time PCR formats compared for the quantitative detection of human cytomegalovirus DNA.* Clinical Chemistry 1999;45:11:1932-1937.
109. Caliendo AM, Schurman R, Yen-Lieberman B et al. *Comparison of quantitative and qualitative PCR assays for cytomegalovirus DNA in plasma.* J Clin Microbiol 2000; 39: 1334-1338.
110. Zipeto D, Baldanti F, Zella D et al. *Quantification of human cytomegalovirus DNA in peripheral blood polymorphonuclear leukocytes of immunocompromised patients by the polymerase chain reaction.* J Virol Meth 1993;44:45-56.
111. Tong C Y, Cuevas L, Williams H, and Bakran A. *Comparison of two commercial methods for measurements of cytomegalovirus load in blood samples after renal transplantation.* J Clin Microbiol 2000; 38: 1209-1213.
112. Nitsche A, Steuer N, Schmidt A et al. *Detection of human cytomegalovirus DNA by real-time quantitative PCR.* J Clin Microbiol 2000;38: 2734-2737.
113. Manez R, Kusne S, Rinaldo C Et al. *Time to detection of cytomegalovirus (CMV) DNA in blood leukocytes is a predictor for the development of CMV disease in CMV-seronegative recipients of allografts from CMV- seropositive donors following liver transplantation.* J Inf Dis. 1996; 173: 1072-1076.

114. Kühn JE, Wendland T, Schäfer P et al. *Monitoring of renal allograft recipients by quantitation of human cytomegalovirus genomes in peripheral blood leucocytes.* J Med Virol 1994; 44:398-405.
115. Blank BSN, Meenhorst PL, Mulder JW et al. *Value of different assays for detection of human cytomegalovirus (HCMV) in predicting the development of HCMV disease in human immunodeficiency virus-infected patients.* J Clin Microbiol 2000;38:563-569.
116. Grossi P, Minoli L, Percivalle E et al. *The cytomegalovirus-antigenemia assay in the diagnosis of posttransplant cytomegalovirus infection.* J Am Soc Nephrol 1994;4:1615-1622.
117. Barrett-Muir W, Aitken C, Templeton K et al. *Evaluation of the Murex Hybrid Capture Cytomegalovirus DNA Assay versus plasma Shell Vial Assay for diagnosis of human cytomegalovirus viremia in immunocompromised patients.* J Clin Microbiol 1998;36: 2554-2556.
118. Van den Berg AP, Van Son WJ, Haagsma EB, et al. *Prediction of recurrent cytomegalovirus disease after treatment with ganciclovir in solid-organ transplant recipients.* Transplantation 1993;55:847-851.
119. Halwachs-Baumann G, Wilders-Truschnig M, Enzinger G et al. *Cytomegalovirus diagnosis in renal and bone marrow transplant recipients: the impact of molecular assays.* J Clin Virol 2000;20:49-57.
120. Murray BM, Amsterdam D, Gray V, et al. *Monitoring and diagnosis of cytomegalovirus infection in renal transplantation.* J Am Soc Nephrol 1997;8:1448-1457.

